

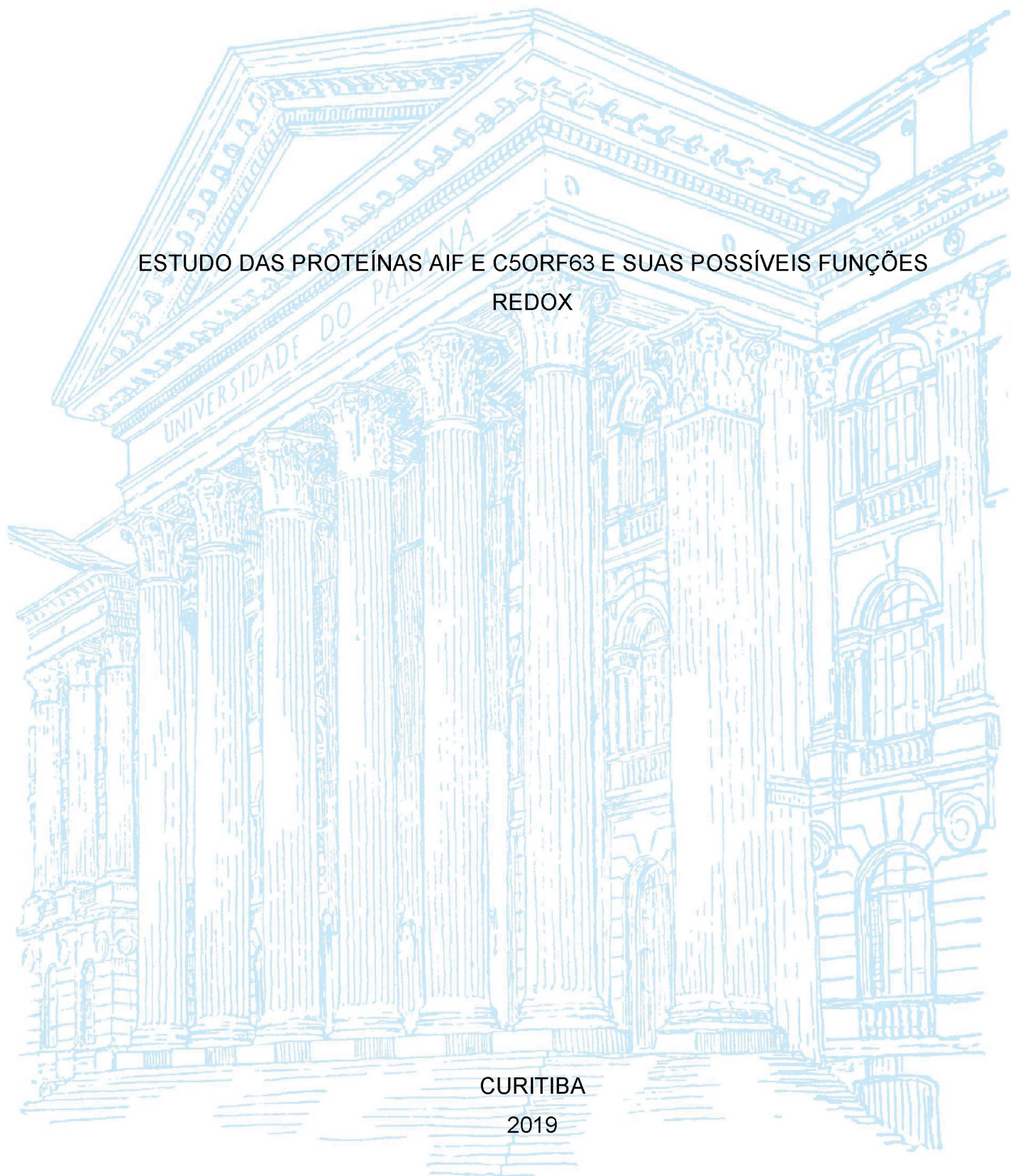
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SZE MEI LO

ESTUDO DAS PROTEÍNAS AIF E C5ORF63 E SUAS POSSÍVEIS FUNÇÕES
REDOX

CURITIBA

2019



SZE MEI LO

ESTUDO DAS PROTEÍNAS AIF E C5ORF63 E SUAS POSSÍVEIS FUNÇÕES
REDOX

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Básica.

Orientadora: Profa. Dra. Lia Sumie Nakao

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

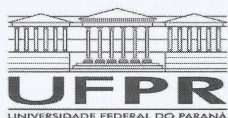
Lo, Sze Mei
Estudo das proteínas AIF e C5orf63 e suas possíveis funções redox. /
Sze Mei Lo. – Curitiba, 2019.
118 f.: il.

Orientadora: Lia Sumie Nakao

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia..

1. Fator de indução de apoptose. 2. Cisteína. 3. Mitocôndria. 4.
Proteínas. I. Título. II. Nakao, Lia Sumie. III. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 572.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de SZE MEI LO intitulada: **Estudo das proteínas AIF e C5orf63 e suas possíveis funções redox**, sob orientação da Profa. Dra. LIA SUMIE NAKAO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Dezembro de 2019.

LIA SUMIE NAKAO
Presidente da Banca Examinadora

LUIZA HELENA GREMSKI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

FRANCISCO FILIPAK NETO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

WANDERSON DUARTE DA ROCHA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AUGUSTO SAVIO PEIXOTO RAMOS
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

*Dedico à Deus que me ama muito e
sempre me deu mais do que pedi e imaginei.
À minha família que sempre me apoiou.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a Deus pelo seu amor incondicional e por ter me acompanhado e ajudado nessa etapa.

À minha orientadora Dra Lia Sumie Nakao, que me ensinou e me incentivou desde a iniciação científica.

Ao Dr Vadim Gladyshev, que me recebeu durante o doutorado sanduíche nos Estados Unidos e me proporcionou uma experiência tão inesquecível.

Aos professores Dr Silvio Zanata e Dra Adriana Mercadante pelos conselhos e acesso a equipamentos e reagentes.

Aos membros da banca avaliadora, pela disponibilidade e pelas contribuições.

Aos colaboradores que auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus colegas e amigos do laboratório que compartilharam tantos momentos comigo nessa jornada.

Aos meus pais, minha irmã e meus parentes por serem meu apoio.

Aos meus irmãos da família de Deus pelas suas orações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, bem como, à Universidade Federal do Paraná.

À agência de fomento CAPES pelas bolsas de estudos no Brasil e nos Estados Unidos.

RESUMO

As proteínas redox, as quais possuem funções intermediadas pelas modificações dos resíduos de cisteínas, são de grande importância para a fisiologia celular. Na primeira parte desse trabalho foi estudado o *apoptosis-inducing fator* (AIF), uma flavoproteína encontrada na membrana interna mitocondrial voltada para o espaço intermembranas. Ela é conhecida pela sua atividade apoptótica, independente da via das caspases. Sob estímulo apoptótico é clivada proteoliticamente na mitocôndria e translocada para o núcleo promovendo degradação do DNA em larga escala. Entretanto, em condições fisiológicas AIF pode estar envolvida no complexo I da cadeia transportadora de elétrons, sendo importante para a fosforilação oxidativa. A AIF possui três resíduos de cisteína na sua forma madura. Esse aminoácido pode sofrer modificações no seu grupo tiol (-SH). A hipótese é que essas cisteínas oxidadas a dissulfeto possam ter algum papel na função de AIF. Portanto, foram utilizadas abordagens *in vitro* de proteína recombinante e em cultivo celular para investigar o possível papel das cisteínas da AIF. A proteína recombinante incubada com 0,5 mM de diamida, um oxidante de tiol a dissulfeto, induziu a formação de bandas com migração eletroforética de aproximadamente 70 e 170 kDa em géis não redutores, essas bandas desaparecem em condições redutoras. Esse mesmo efeito foi observado em modelo celular superexpressando AIF-HA exógena tratada com 75 μ M de diamida e 500 μ M de peróxido de hidrogênio. Entretanto, foi observado nos dois modelos de estudo que a mutação de qualquer um dos três resíduos de cisteínas presentes na AIF leva à diminuição e até completa ausência desses conjugados ligados por dissulfeto (CLD). Os dados de espectrometria de massas dos fragmentos de AIF digeridos por tripsina confirmaram que todas as três cisteínas são oxidáveis. Investigamos se a proteína redox tiorredoxina 1 (Trx1), previamente descrita como parceiro molecular de AIF, seria capaz de reduzir os dissulfetos dos CLD de AIF. Os resultados tanto em modelo *in vitro* quanto em modelo celular dão indícios de que Trx1 é capaz de desfazer os CLD. Na segunda parte desse trabalho foi investigado a proteína possivelmente redox, glutaredoxin-like, C5orf63 (humana) e YDR286C (levedura), que apresenta domínio CxxC (duas cisteínas intercaladas por dois aminoácidos). Dados computacionais demonstraram que C5orf63 e YDR286C são homólogas ortólogas e possuem um peptídeo-sinal de endereçamento para mitocôndria. A localização mitocondrial foi confirmada usando um construto com GFP, tanto em células humanas quanto em leveduras. Ambas as proteínas são pouco solúveis quando expressas em bactérias e leveduras. Os resultados preliminares mostraram que C5orf63 apresenta termoestabilidade e uma possível atividade peroxidásica, mas não apresentou atividade de glutaredoxina, analisada pelo ensaio HED. As leveduras com deleção do gene da YDR286C crescem similarmente ao selvagem, mesmo sob condições oxidantes de peróxido de hidrogênio ou diamida, mas apresentaram menor longevidade quando comparadas às leveduras selvagens. Portanto, esses dados indicam que C5orf63 e YDR286C não são proteínas essenciais e podem ter um papel a fisiologia mitocondrial.

Palavras-chave: Apoptosis-inducing factor, cisteína, mitocôndria, tiorredoxina, C5orf63, YDR286C.

ABSTRACT

Redox proteins, whose functions depends on modifications in cysteine residues, are important for cell physiology. In the first part of this work, we studied apoptosis-inducing factor (AIF), a flavoprotein present in mitochondrial inner membrane facing the intermembrane space. It is known for its apoptotic activity, independent of caspases. Upon apoptotic stimulus it is proteolytically cleaved and translocated to the nucleus promoting large-scale DNA degradation. However, under physiological conditions, AIF may be involved in electron transport chain complex and is important for oxidative phosphorylation. The mature form of AIF has three cysteine residues. This aminoacid is susceptible to changes in its thiol group (-SH). Here, we hypothesized that cysteine oxidation to disulfide might have a role in AIF function. Therefore, in vitro approaches with recombinant proteins and cell culture were used to evaluate oxidation of AIF cysteines. The recombinant protein incubated with 0.5 mM diamide, a known thiol oxidant to disulfide, induced the appearance of bands with electrophoretic migration of approximately 70 and 170 kDa in nonreducing gels, that disappear under reducing conditions. This same effect was observed in the cellular model overexpressing AIF-HA treated with 75 μ M diamide or 500 μ M hydrogen peroxide. However, it was observed in this two models that mutation of any of the three AIF cysteines leads to the decrease and even absence of these disulfide-linked conjugates (DLC). Mass spectrometry data from trypsin-digested AIF fragments confirmed that all three cysteines are oxidizable. We investigated whether redox protein thioredoxin 1 (Trx1), molecular partner of AIF, could reduce AIF's DCL disulfides. Both the in vitro and cellular models indicated that Trx1 is capable of reducing DCL. In the second part, we investigated a possible redox protein, glutaredoxin-like, C5orf63 (human) or YDR286C (yeast), which has CxxC domain (two cysteines separated by two amino acids). Computational data demonstrated that C5orf63 and YDR286C are orthotic homologues and have a mitochondrial peptide signal. The mitochondrial localization was confirmed by using a construct with GFP, in both mammalian and yeast cells. Both proteins are weakly soluble, when expressed in bacterial and yeast system. The preliminary results showed that C5orf63 presents thermostability and a possible peroxidase activity, but no glutaredoxin activity, analysed by the HED assay. Yeast lacking YDR286C gene grow similarly to wild-type, even under oxidative conditions, induced by hydrogen peroxide or diamide, but seem to decreased life span compared to wt yeast. Thus, these data indicate that C5orf63 anf YDR286C are not essential proteins, that might have a role in mitochondria physiology.

Keywords: Apoptosis-inducing factor 1 (AIF1), thioredoxin 1 (Trx1), mitochondria, C5orf63, YDR286C.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 . MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DOS GRUPOS TIOIS DE PROTEÍNAS.....	17
FIGURA 2 . ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ORGANIZAÇÃO DE GENES E ISOFORMAS DE AIF1 HUMANO.....	23
FIGURA 3 . ESQUEMA REPRESENTATIVO DO ANCORAMENTO E PROCESSAMENTO PROTEOLÍTICO DO AIF NO ESPAÇO INTERMEMBRANAS MITOCONDRIAL.....	23
FIGURA 4 . GEL DA PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS hAIF Δ 1-120 SELVAGEM DE MUTADAS.....	36
FIGURA 5 . PROTEÍNA RECOMBINANTE HAIF Δ 1-120 PURIFICADA.....	36
FIGURA 6 . DIAMIDA INDUZ A FORMAÇÃO DE CONJUGADOS LIGADOS POR DISSULFETO EM hAIF Δ 1-120.....	38
FIGURA 7 . SDS-PAGE DE ALTA RESOLUÇÃO DOS CLD PRODUZIDOS DE hAIF Δ 1-120 EXCISADAS PARA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	39
FIGURA 8 . IDENTIFICAÇÃO DOS CROSSLINK DE UM DISSULFETO DA AIF ENTRE OS RESÍDUOS 317 E 256.....	40
FIGURA 9 . IDENTIFICAÇÃO DOS CROSSLINK DE UM DISSULFETO DA AIF ENTRE OS RESÍDUOS 441 E 256.....	40
FIGURA 10 . SDS-PAGE DE ALTA RESOLUÇÃO DOS CLD PRODUZIDOS DE hAIF Δ 1-120.....	41
FIGURA 11 . AIF FORMA CONJUGADOS LIGADOS POR DISSULFETO (CLD) EM MODELO CELULAR.....	43
FIGURA 12 . TRX1 TEM UM PAPEL NA REDUÇÃO DE CLD DA AIF.....	45
FIGURA 13 . QUANTIDADE DE CLD EM CÉLULAS COM SILENCIAMENTO DE TRX1 E COM RECUPERAÇÃO.....	46
FIGURA 14 . LOCALIZAÇÃO MITOCONDRIAL DE AIF-HA, AIF C256S-HA, AIF C317S-HA E AIF C441S-HA SUPEREXPRESSOS EM CÉLULAS HELA.....	47
FIGURA 15 . LOCALIZAÇÃO MITOCONDRIAL DE TIORREDOXINA 1.....	49
FIGURA 16 . AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM CÉLULAS HEK293T SUPEREXPRESSANDO AIF-HA E MUTANTES.....	50

FIGURA 17 . ESQUEMA REPRESENTATIVO DO DOBRAMENTO TIORREDOXINA	56
FIGURA 18 . MOTIVO CXXC DAS TIORREDOXINAS E MÉTODO DE TRAPPING MUTANT.....	57
FIGURA 19 . MECANISMO GERAL DO SISTEMA TIORREDOXINA.....	58
FIGURA 20 . MECANISMO GERAL DA ATIVIDADE DAS GLUTARREDOXINAS....	59
FIGURA 21 . ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE YDR286C DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E GLUTARREDOXINA-LIKE (C5ORF63) DE <i>Homo sapiens</i> , COM GLUTARREDOXINA 1, 2, 4 E 5 DE <i>Homo sapiens</i>	68
FIGURA 22 . ANÁLISE DA FILOGENIA DO GENE YDR286C E C5ORF63 NO BANCO DE DADOS.....	69
FIGURA 23 . PREDIÇÃO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR.....	69
FIGURA 24 . TESTE DE SOLUBILIDADE DE C5orf63.....	70
FIGURA 25 . GEL DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C5orf63.....	71
FIGURA 26 . ANÁLISE POR DICROÍSMO CIRCULAR DE C5orf63.....	71
FIGURA 27 . ESQUEMA REPRESENTATIVO DO ENSAIO HED.....	72
FIGURA 28 . ENSAIO HED PARA ATIVIDADE DE GLUTARREDOXINA.....	73
FIGURA 29 . ENSAIO FOX PARA ATIVIDADE DE PEROXIDASE.....	74
FIGURA 30 . LOCALIZAÇÃO DE C5ORF63 EM HEK293T APÓS ESTÍMULO OXIDANTE.....	75
FIGURA 31 . LOCALIZAÇÃO MITOCONDRIAL DE YDR286C EM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
FIGURA 32 . ENSAIO DE VIABILIDADE DE EM LEVEDURAS SELVAGEM E Δ YDR286C	77
FIGURA 33 . ENSAIO DE VIABILIDADE DE EM LEVEDURAS SELVAGEM E Δ YDR286C COM TRATAMENTOS.....	78
FIGURA 34 . ENSAIO DE LONGEVIDADE DAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
FIGURA 35 . EXPRESSÃO DE YDR286C-TEV-HA EM LEVEDURAS.....	81
FIGURA 36 . EXPRESSÃO DE YDR286C-TEV-HA EM LEVEDURAS.....	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 . PRIMERS PARA SUBCLONAGEM DAS MUTAÇÕES hAIF Δ 1-120 DO VETOR pCIneo PARA pET28a.....	30
TABELA 2 . IDENTIFICAÇÃO DO RESÍDUO DE CISTEÍNA OXIDADO NOS FRAGMENTOS DE hAIF Δ 1-120 DIGERIDOS POR TRIPSINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	41
TABELA 3 . PRIMERS PARA CLONAGEM DE C5orf63 NO VETOR pET28a.....	62
TABELA 4 . PRIMERS PARA CLONAGEM DE YDR286C-TEV-HA NO VETOR p426gpd.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	-	<i>Apoptosis-inducing fator</i>
AIF C256S	-	AIF com substituição da cisteína 256 para serina
AIF C317S	-	AIF com substituição da cisteína 317 para serina
AIF C441S	-	AIF com substituição da cisteína 441 para serina
BHT	-	Butil hidroxitolueno
BSA	-	<i>Bovine serum albumin</i>
C5orf63	-	<i>Chromosome 5 Open Reading Frame 63</i>
CLD	-	Conjugados ligados por dissulfeto
CSM-URA	-	<i>Complete Supplement Mixture without Uracil</i>
CTRL	-	Controle
DA	-	Diamida
DAPI	-	4',6 diamidino-2-fenil indol
DMEM	-	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTPA	-	<i>Diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
DTT	-	Ditiotreitol
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIM	-	Espaço intermembranas mitocondrial
ENO	-	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	-	Espécies reativas de oxigênio
FAD	-	Flavina-adenina dinucleotídeo
Gpx	-	Glutathione peroxidase
GRX	-	Glutarredoxina
GSH	-	L-Glutathione reduzida
GSSG	-	Glutathione dissulfeto
HA	-	Hemaglutinina
hAIF Δ 1-120	-	<i>Human Apoptosis-inducing fator</i>
HED	-	2-Hidroxietil dissulfeto
HRP	-	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsp70	-	<i>Heat shock protein 70</i>
IPTG	-	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	-	kilo Dalton

LB	- Meio Luria-Bertani
MBP	- <i>Maltose binding protein</i>
MEM	- <i>Minimum Essential Media</i>
MIF	- Fator inibitor de migração de macrófago
MLS	- Sequência de localização mitocondrial
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
PBS	- <i>Phosphate buffer saline</i>
PRX	- Peroxirredoxina
PTEN	- <i>Phosphatase and tensin homolog on chromosome ten</i>
SDS – PAGE	- <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	- Soro fetal bovino
ST	- Estaurosporina
TBS	- <i>Tris-buffered saline</i>
TEV	- <i>Tobacco Etch Virus</i>
TrxR1	- Tiorredoxina reductase 1
Trx1	- Tioxirredoxina 1
YPD	- <i>Yeast peptone dextrose</i>
βME	- β-mercaptoetanol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	16
CAPÍTULO I.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 OBJETIVOS GERAIS.....	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 ESTRUTURA DO AIF.....	22
2.2 FUNÇÕES DO AIF.....	24
2.2.1 Atividade apoptótica.....	24
2.2.2 Funções fisiológicas.....	25
2.2.3 Funções redox.....	27
2.3 CISTEÍNAS DO AIF.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 REAGENTES.....	29
3.2 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES hAIF Δ 1-120 SELVAGEM E MUTADAS E hTRX1.....	30
3.3 OXIDAÇÃO DAS hAIF Δ 1-120 RECOMBINANTES SELVAGEM E MUTADAS.....	30
3.4 SDS-PAGE REDOX BIDIMENSIONAL.....	31
3.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	31
3.6 INTERAÇÃO ENTRE TRX1 REDUZIDA COM AIF OXIDADO.....	32
3.7 TRATAMENTO OXIDANTE DAS CÉLULAS.....	32
3.8 <i>WESTERN BLOT</i>	33
3.9 <i>KNOCKDOWN</i> DE TRX1 E SUPEREXPRESSÃO DE AIF EM HEK293T.....	33
3.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	33
3.11 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE.....	34
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS AIF RECOMBINANTES SELVAGEM E MUTADAS.....	35
4.2 OXIDAÇÃO DA PROTEÍNA AIF RECOMBINANTE INDUZ A FORMAÇÃO DE CONJUGADOS LIGADOS POR DISSULFETO (CLD).....	37

4.3 AIF FORMA CONJUGADOS LIGADOS POR DISSULFETO EM HEK293T.....	42
4.4 PAPEL DA TRX1 NA REDUÇÃO DOS CLD DO AIF	44
4.4 INTERAÇÃO DE AIF-TRX1.....	46
4.5 CISTEÍNAS DA AIF E FUNÇÃO APOPTÓTICA.....	50
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO.....	53
CAPÍTULO II.....	54
1 INTRODUÇÃO.....	54
1.1 OBJETIVO GERAL.....	55
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	56
2.1 SUPERFAMÍLIA TIORREDOXINA.....	56
2.2 TIORREDOXINA 1.....	58
2.3 GLUTARREDOXINAS.....	59
2.4 C5ORF63 E YDR286C.....	59
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.1 REAGENTES.....	61
3.2 ANÁLISE COMPUTACIONAL DE C5ORF63 E YDR286C.....	61
3.3 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA C5ORF63 RECOMBINANTE.....	61
3.4 DICROÍSMO CIRCULAR.....	62
3.5 ATIVIDADE DE GLUTARREDOXINA - ENSAIO HED (2-HIDROXIETIL DISSULFETO).....	63
3.6 ATIVIDADE PEROXIDÁSICA- ENSAIO FOX.....	63
3.7 LOCALIZAÇÃO CELULAR EM HEK293T.....	63
3.8 CLONAGEM DE YDR286C.....	64
3.9 ESTUDO DO FENÓTIPO Δ YDR286C.....	65
3.9.1 Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
3.9.2 Transformação de leveduras.....	65
3.9.3 Ensaio de viabilidade de leveduras.....	66
3.9.4 Ensaio de longevidade.....	66
3.10 EXPRESSÃO DE YDR286C-TEV-HA EM LEVEDURAS.....	67
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
4 RESULTADOS.....	68

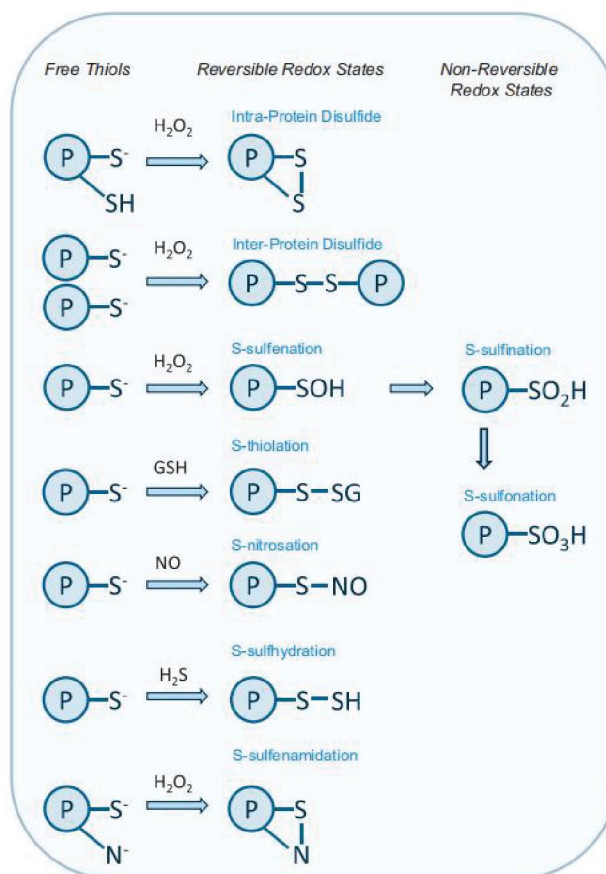
4.1 ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS ESTRUTURAS PRIMÁRIAS DA C5ORF63 E YDR286C.....	68
4.2 ATIVIDADE REDOX DA PROTEÍNA RECOMBINANTE C5ORF63.....	70
4.3 LOCALIZAÇÃO CELULAR.....	74
4.4 FENÓTIPO Δ YDR286C.....	75
4.5 BUSCA DE INTERAÇÕES PROTEICAS.....	80
5 DISCUSSÃO.....	82
6 CONCLUSÃO.....	85
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
8 PERSPECTIVAS.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO 1- MANUSCRITO CAPÍTULO I.....	93
ANEXO 2- TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO DE YDR286C-TEV-HA.....	117

INTRODUÇÃO GERAL

O aminoácido cisteína possui na sua cadeia lateral o grupo tiol (SH), que apresenta diferentes reatividades. Essa reatividade, dependente do pKa, é modulada pelo microambiente no qual esse resíduo de cisteína se encontra. Quanto menor o pKa de um grupo tiol, maior a proporção da forma tiolato (S-) em pH fisiológicos. Os tiolatos podem ser oxidados formando dissulfetos (S-S) (NAGY, 2013), ácidos sulfênico (SOH) (LEONARD et al., 2011; POOLE et al., 2003), sulfínico (SO₂H) (WOOD et al., 2003) sulfônico (SO₃H) ou podem ser nitrosados (S-NO) (STAMLER et al., 1992; HESS et al., 2005) (FIGURA 1). Um exemplo de efeito fisiológico das modificações das cisteínas é a regulação redox de proteínas tirosina fosfatases. Essa família de enzimas é responsável pela regulação do estado de fosforilação celular. Quando ocorre oxidação, levando a formação de um dissulfeto intramolecular, essas enzimas são inativadas perdendo a capacidade de desfosforilar (CHO et al, 2004).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são responsáveis pela oxidação dos tiois. As ERO e ERN são produzidas fisiologicamente durante o metabolismo celular, provenientes principalmente da mitocôndria. Sabe-se que essas moléculas podem atuar como mensageiros secundários de vários processos fisiológicos, como sinalização celular (D'AUTREÁUX et al, 2007; HOLMSTRÖM et al 2014; ZHU et al, 2017). Quando em excesso, essas moléculas oxidantes podem gerar um desequilíbrio da sinalização celular e redox (JONES et al., 2010) chamado de estresse oxidativo, que pode danificar biomoléculas e levar à morte celular (HALLIWELL, 2007; JONES et al., 2008; SIES et al., 2017).

FIGURA 1. MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DOS GRUPOS TIOIS DE PROTEÍNAS



FONTE: Rudyk e Eaton (2014)

LEGENDA: Oxidações nos grupos sulfidril levam a modificações reversíveis como dissulfetos intramolecular ou intermolecular, S-sulfenação, S-nitrosilação, S-tiolação, S-sulfidração, S-sulfenamidação e a oxidações irreversíveis como a S-sulfinação e S-sulfonação.

As modificações reversíveis das cisteínas podem tanto intermediar interações entre proteínas quanto a atividade das tiois proteína. Um exemplo conhecido é a proteína tioredoxina 1 (Trx1), que juntamente com a proteína tioredoxina redutase 1 (TR1) e peroxirredoxinas compreendem em uma das principais defesas antioxidante das células. O sítio ativo da Trx1 contém o motivo ditiólico, Cys-Gly-Pro-Cys (CxxC) (dois resíduos de cisteína flanqueando outros dois aminoácidos), responsável pela redução de proteínas-alvo. Quando exerce sua função antioxidante, a Trx1 torna-se oxidada, com uma ligação dissulfeto intramolecular formada entre as duas cisteínas do sítio ativo. Para voltar ao estado ativo (reduzido), é reduzida pela TR1 que utiliza o doador de elétrons NADPH (HOLMGREN, 1978). Um dos mais importantes alvos da Trx1 são as peroxirredoxinas (Prx). Essas proteínas são facilmente oxidadas pelo peróxido de

hidrogênio (RHEE et al, 2011) e dependem da ação antioxidante da Trx1 para serem novamente reduzidas ao seu estado ativo.

Tendo em vista a importância das proteínas redox e o efeito das modificações pós-traducionais das cisteínas sobre essas, o presente trabalho visou estudar a oxidação dos resíduos de cisteína a dissulfeto da proteína *apoptosis-inducing factor 1* (AIF) e a reversão dessa oxidação pela Trx1 (Capítulo I) e a caracterização inicial da proteína C5orf63/YDR286C, que contém o motivo CxxC e possivelmente possui atividade redox (Capítulo II).

CAPÍTULO I

Oxidação de Apoptosis-inducing factor (AIF) a conjugados ligados por dissulfeto

1 INTRODUÇÃO

O apoptosis-inducing factor (AIF) é uma flavoproteína que se encontra com a porção N-terminal fixada na membrana interna da mitocôndria e com a porção C-terminal voltada para o espaço intermembranas. A estrutura primária da proteína precursora (pré-proteína) do AIF humano possui 613 aminoácidos (67 kDa), e é direcionada para o espaço intermembranas da mitocôndria. Lá, ocorre a retirada do peptídeo sinal resultando na forma madura de 62 kDa ($\Delta 1-53$) que é ancorada na membrana interna pela sequência hidrofóbica (66-84) (OTERA et al., 2005). Esta forma madura encontrada no espaço intermembranas e fixada na membrana interna mitocondrial pela parte N-terminal, contém 3 resíduos de cisteínas (SUSIN et al., 1999). Quando a célula recebe um estímulo apoptótico específico, o AIF1 maduro é clivado proteoliticamente para uma forma de 57 kDa que se transloca para o núcleo, onde degrada o material genético, induzindo a morte celular via apoptose independente de caspases (SUSIN et al., 1999). Apesar do AIF ter sido primeiramente descoberto como uma molécula pró-apoptótica (JOZA et al., 2001; SEVRIOUKOVA, 2011; BANO E PREHN, 2018), posteriormente, suas funções fisiológicas ficaram cada vez mais evidentes, pois já foi observado que a redução de expressão interfere na fosforilação oxidativa, devido à diminuição de expressão de proteínas do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (VAHSEN et al., 2004, APOSTOLOVA et al., 2006). O camundongo Harlequin (Hq), que possui redução de 80% da expressão de AIF, por uma inserção retroviral no primeiro íntron do gene do AIF, mostra sinais de danos oxidativos e aumento de morte induzida por peróxido de hidrogênio, sugerindo atividade antioxidante (KLEIN et al., 2002). Posteriormente foi mostrado que AIF é necessário para a expressão da proteína CHCHD4 no espaço intermembranas mitocondrial (EIM). Na ausência de CHCHD4, a expressão de várias subunidades do complexo transportador de elétrons é comprometida (HAGEN et al., 2015; MEYER et al., 2015), levando aos danos na respiração e fosforilação oxidativa observados (VAHSEN et al., 2004; APOSTOLOVA et al., 2006) e possivelmente à morfologia aberrante da mitocôndria, descrita nos neurônios deficientes de AIF (CHEUNG et al., 2006). As características redox de AIF são

atribuídas pela sua atividade NAD(P)H oxidase (MIRAMAR et al., 2001), em que se forma um complexo estável de transferência de carga com o cofator FAD, determinando a baixa capacidade de transferência de elétrons do NAD(P)H para outras moléculas (CHURBANOVA E SEVRIUKOVA, 2008). O envolvimento das cisteínas (grupo tiol) ainda não está bem claro, e o papel destes resíduos na função redox do AIF ainda precisa ser esclarecido. AIF humano possui três resíduos de cisteína na sua forma madura, nas posições 256, 317 e 441. Com a exceção do resíduo 441 nenhum está exposto na superfície de AIF (SEVRIUKOVA, 2011). No entanto, um dos resíduos de cisteína do AIF pode ter importância redox, pois em outros estudos foi observado que *para-chloromercuriphenylsulfonic acid* (pCMPS), um bloqueador de tiol, induz a diminuição da atividade apoptótica do AIF1 (MIRAMAR et al., 2001). Além disso, um estudo recente mostrou que AIF1 é uma das proteínas que interagem com a tioredoxina (Trx1) por mecanismo redox, mediada pela ligação entre pelo menos um resíduo de cisteína do AIF com a cisteína nucleofílica do motivo CxxC da Trx1 (NAKAO, 2015). Foi demonstrado que a interação entre Trx1 e AIF depende de pelo menos dois resíduos de cisteína do AIF (SHELAR et al., 2015). Um trabalho mais recente mostrou que a proteína homóloga de AIF em *C. elegans*, a WAH1, é oxidada a dímeros via formação de dissulfeto intra e intermolecular de diversas cisteínas. Apesar da ampla diversidade de dados presentes na literatura, é evidente que o papel dos resíduos de cisteína do AIF ainda está obscuro, e devido à ubiquidade desta proteína e seu papel importante, tanto fisiológica como patologicamente, este assunto merece mais estudos.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a possibilidade de oxidação dos resíduos de cisteína da proteína *apoptosis-inducing factor 1* e sua reversibilidade, *in vitro* e em células em cultura.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

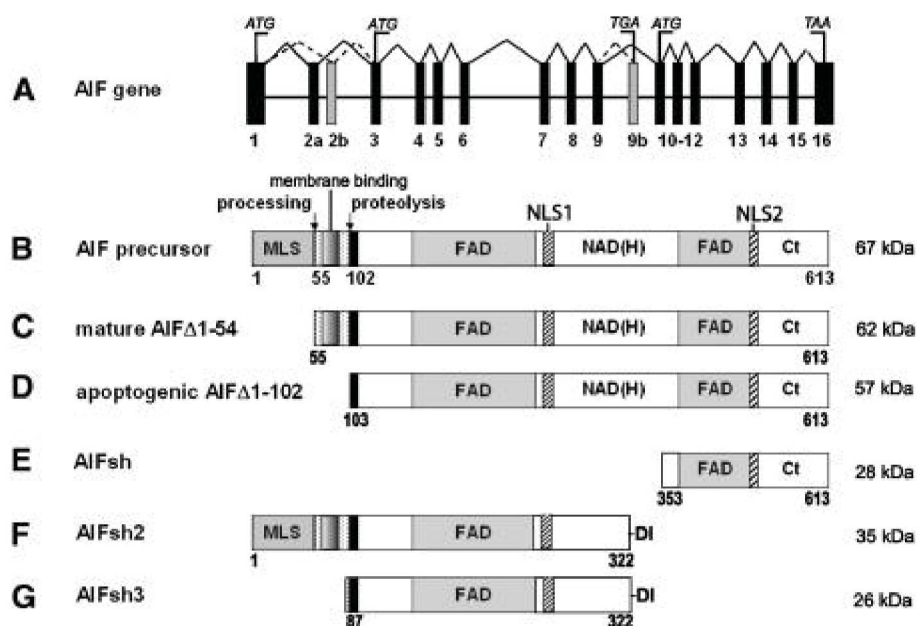
- Avaliar se os resíduos de cisteína do AIF recombinante e de AIF superexpressa em células humanas podem ser oxidados por diamida e peróxido de hidrogênio a dissulfeto;
- Identificar os resíduos de cisteínas envolvidos nas pontes dissulfeto;
- Investigar se Trx1 reduz os dissulfetos do AIF, *in vitro* e em células.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA DO AIF

O apoptosis-inducing factor (AIF), também conhecido como *programmed cell death protein 8* (PCD8), foi descoberto em 1996 (SUSIN et al., 1996; ZAMZAMI et al., 1996) e é uma flavoproteína, dependente do cofator dinucleótido de flavina e adenina (FAD). Esta proteína é codificada por um único gene (AIFM1) no cromossomo Xq25-26 na região A6 em humanos (DAUGAS et al., 2000), com 92% de identidade com o AIF de camundongos (SUSIN et al., 1999). O transcrito do AIF humano, que contém 16 éxons, pode sofrer *splicing* alternativo, originando além da isoforma canônica AIF1, outras três isoformas mais curtas (DELETTRE et al., 2006) (FIGURA 2). Além dessas três variantes de *splicing* menores, há uma isoforma específica do cérebro e retina, conhecida como AIF2, que usa o exon 2b ao invés do 2a. A forma humana precursora do AIF1 possui 613 aminoácidos (67 kDa), a qual é sintetizada no citosol e é endereçada para a mitocôndria pela sequência de localização mitocondrial (MLS) (SUSIN et al., 1999). Na mitocôndria ocorre uma clivagem no aminoácido 53, removendo a MLS da região N-terminal (OTERA et al., 2005). Em seguida, a proteína de 62 kDa é ancorada na membrana interna, através da região hidrofóbica, localizada entre os resíduos 66 a 84, deixando a porção carboxi-terminal voltada para o espaço intermembranas (FIGURA 3- Esquerda). Os aminoácidos restantes do C-terminal possuem homologia com ferredoxinas ou NADPH oxidoredutases de plantas, fungos e eubactérias (LORENZO et al., 1999). Nessa estrutura encontram-se dois sítios de ligação de FAD, intercalados por um segmento de ligação ao NADH, além de duas sequências de localização nucleares (NLS) (SUSIN et al., 1999) (FIGURA 2).

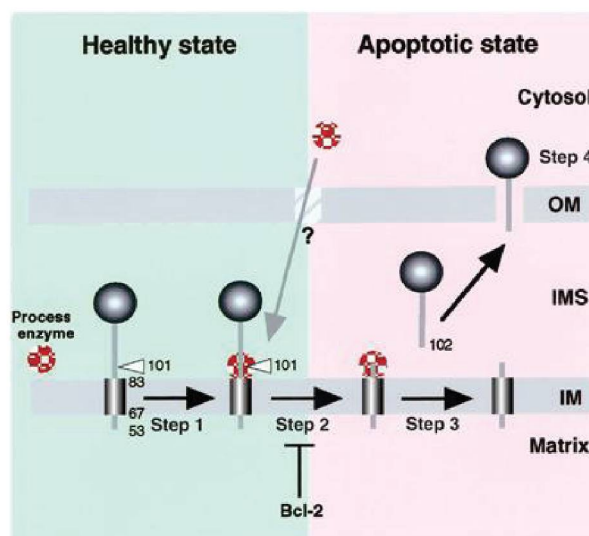
FIGURA 2. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ORGANIZAÇÃO DE GENES E ISOFORMAS DE AIF1 HUMANO



FONTE: Sevrioukova (2011)

LEGENDA: Gene do AIF com 16 éxons, forma precursora do AIF com 613 aminoácidos (67 kDa), forma madura do AIF, sem MLS (62 kDa), forma apoptogênica da AIF, após proteólise (57 kDa) e outras três isoformas curtas da AIF (28 kDa, 35 kDa e 26 kDa). MLS, *mitochondrial localization sequence*. NLS, *nuclear leading sequence*.

FIGURA 3. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO ANCORAMENTO E PROCESSAMENTO PROTEOLÍTICO DO AIF NO ESPAÇO INTERMEMBRANAS MITOCONDRIAL



FONTE: Otera (2005)

LEGENDA: AIF ancorado na membrana interna da mitocôndria pela sequência hidrofóbica, aminoácido 66 a 84. Sob estímulo apoptótico a protease, ganha acesso ao AIF, clivando no resíduo 101 liberando a forma solúvel para o citoplasma para efetivar sua função apoptótica.

2.2 FUNÇÕES DO AIF

2.2.1 Atividade apoptótica

O AIF foi originalmente caracterizado como uma proteína associada à apoptose, que depende da translocação nuclear. Para isso é necessário que o AIF seja liberado da mitocôndria, após proteólise dependente de calpaína no aminoácido 101 (OTERA et al., 2005) (FIGURA 3- Direita). Esta proteólise ocorre pela alteração conformacional do AIF na membrana interna mitocondrial na presença do estímulo apoptótico, e aumento de ERO. Além disso, é necessário um aumento na concentração intracelular de íons cálcio para ativar a calpaína (NORBERG et al., 2008; NORBERG et al., 2010). A forma solúvel do AIF possui 57 kDa, sai para o citosol e é translocada para o núcleo, onde causa condensação periférica da cromatina em larga escala (fragmentos de ~50 kb), induzindo a morte celular via apoptose (SUSIN et al., 1999). Essa atividade foi demonstrada *in vitro*, em sistemas livres de células. Neste ensaios, o AIF induzia a fragmentação do DNA em núcleos isolados de células (MIRAMAR et al., 2001). A partir disso, os mecanismos pró-apoptóticos da AIF foram demonstrados. No trabalho de Susin e colaboradores (1999), foi caracterizado que a apoptose induzida pelo AIF é independente da proteína Bcl-2 e das caspases, pois na presença do bloqueador de pan-caspases Z-VAD.fmk os efeitos apoptóticos do AIF se mantiveram. No mesmo trabalho foi caracterizado o fenótipo apoptótico gerado pelo AIF, que envolve a redução do potencial transmembrânico da mitocôndria, a indução da condensação da cromatina e a fragmentação nuclear (carriorréxis). Essa função apoptogênica independe da presença de FAD, mas depende da conformação do AIF (SUSIN et al., 1999).

O AIF não possui atividade de nuclease intrínseca, mas a estrutura cristalográfica revelou, além da região de atividade oxidoredutase, um sítio de ligação ao DNA (YE et al., 2002). Além da interação física de AIF com o material genético, foi descrito que AIF interage com a nuclease fator inibidor de migração de macrófago (MIF) no citoplasma, os quais translocam juntos para o núcleo permitindo a clivagem do DNA (WANG et al., 2016). Em *C. elegans*, a ortóloga da endonuclease G, CPS-6, que é regulada pelo AIF (WANG et al., 2002; PARRISH et al., 2001; LIN et al., 2016), exerce a função de clivagem do DNA observada no fenótipo de apoptose via AIF. Existem evidências de que AIF também interage com

a histona H2AX auxiliando no processo de degradação do DNA no processo apoptótico (ARTUS et al., 2010). Além disso, a apoptose mediada por AIF é regulada por proteínas citosólicas que interagem com AIF na sua translocação da mitocôndria para o núcleo. Uma delas é a ciclofilina A (CypA) que interage com AIF, auxiliando sua translocação nuclear (ZHU et al., 2007; CANDÉ et al., 2004). Outra proteína é a *heat shock protein 70* (Hsp70), porém essa interação faz com que o AIF seja neutralizado no citoplasma, impedindo sua função apoptótica no núcleo (RAVAGAN et al., 2001; CANDÉ et al., 2002).

No trabalho de Yu e colaboradores (2009) foi detectado cerca de 30% de AIF de 67kDa associado à membrana externa da mitocôndria, o qual é liberado rapidamente sem a necessidade de clivagem (YU, et al., 2009). Posteriormente foi mostrado que interage com a proteína mortalina, presente na membrana externa mitocondrial, e regula essa ativação mais rápida de AIF para realizar sua atividade apoptótica (FADEEVA et al, 2017)

2.2.2 Funções fisiológicas

Estudos com o camundongo Harlequin (Hq), o qual possui redução de 80% da expressão de AIF por uma inserção retroviral no primeiro íntron do gene da AIF, mostraram que AIF desempenha outras funções fisiológicas, como manutenção da cadeia respiratória mitocondrial e funções antioxidantes. Estes animais mostraram sinais de danos oxidativos, como a degeneração progressiva do cerebelo e envelhecimento dos neurônios da retina (KLEIN et al., 2002). Os cardiomiócitos de camundongos Harlequin são mais sensíveis a morte por peróxido de hidrogênio (0,5 mM por 24 horas), efeito que é revertido com o pré-tratamento com antioxidantes. Esses animais são também menos resistentes à lesão por isquemia-reperfusão (VAN EMPEL et al., 2005). Um achado interessante é o aumento da suscetibilidade à apoptose induzida por peróxido de hidrogênio dos camundongos Harlequin em relação ao camundongo selvagem, sugerindo que AIF pode agir como um “*scavenger*” de espécies oxidantes (KLEIN et al., 2002).

Células *knockdown* para AIF apresentaram aumento dos níveis de espécies oxidantes, determinados por sondas fluorescentes, derivadas da cadeia transportadora de elétrons (CTE). A interpretação deste dado foi que a supressão da expressão de AIF leva à produção de espécies reativas do oxigênio (ERO), que

danificam proteínas da cadeia respiratória, levando a sua disfunção (APOSTOLOVA et al., 2006). Foi descoberto que o AIF pode estar envolvido na biogênese e/ou manutenção da cadeia transportadora de elétrons, pois mutantes dessa proteína resultaram na perda de proteínas do Complexo I e III (VAHSEN et al., 2004). Esse achado sugere a importância do AIF para cadeia transportadora de elétrons (CTE), estabilizando a fosforilação oxidativa.

Recentemente dois estudos independentes caracterizaram o papel do AIF na fisiologia mitocondrial. AIF interage com a proteína mitocondrial CHCHD4, análoga da Mia40 de leveduras, interferindo na biogênese da cadeia respiratória (HANGEN et al., 2015; MEYER et al., 2015). A ausência de AIF induziu uma diminuição da expressão da CHCHD4. Como CHCHD4 tem importante papel na importação e dobramento oxidativo de proteínas da cadeia respiratória, a supressão do AIF leva a uma diminuição da expressão das proteínas dos complexos I e IV (HANGEN et al., 2015), sinalizando que os danos oxidativos observados nos camundongos Harlequin podem ser resultado da falta de CHCHD4.

AIF mostrou-se relevante também para a sobrevivência de células tumorais. Em um estudo com células tumorais de próstata foi demonstrado uma elevação da quantidade de AIF, que ao invés de provocar a morte celular por apoptose, auxiliou na sobrevivência, crescimento e invasão das células tumorais (LEWIS et al., 2012). Essa função também mostrou-se essencial para a sobrevivência de células tumorais pulmonares, uma vez que a deleção do AIF leva à deficiência da fosforilação oxidativa reduzindo a sobrevivência dos camundongos com câncer de pulmão (RAO et al., 2019). Foi mostrado que a importância de AIF para o crescimento das células pulmonares cancerosas é exclusivamente dependente da sua função mitocondrial, pois apenas a ausência de capacidade apoptótica não interfere no crescimento dessas células (FAUBERT et al., 2019).

No conjunto, esses dados mostram o papel fisiológico essencial do AIF na manutenção da cadeia de transporte de elétrons e que níveis diminuídos de AIF podem comprometer a respiração mitocondrial, levando a um aumento na produção de ERO mitocondriais.

2.2.3 Funções redox

A atividade oxidoreductase de AIF está descrita como aquela associada a redução de seu grupo FAD por NAD(P)H. Estudos iniciais mostraram que tanto NADPH como NADH transferem elétrons para o grupo FAD do AIF, produzindo, em condições anaeróbicas um complexo de transferência de carga estável, mesmo após a introdução de ar no sistema (MIRAMAR et al., 2001). Em condições de aerobiose, NADH, preferencialmente sobre NADPH, foi capaz de transferir elétrons para o grupo FAD, que o transfere para o oxigênio molecular, produzindo superóxido (MIRAMAR et al., 2001). Estudos posteriores mostraram que em concentrações fisiológicas de NAD(P)H, AIF está dimerizado, a flavina do AIF encontra-se reduzida, complexada estavelmente com a coenzima, o que determina a baixa transferência de elétrons para oxigênio (CHURBANOVA e SEVRIUKOVA, 2008). Dimerizado, AIF modifica a curvatura da membrana interna mitocondrial e esconde o sítio de clivagem por calpaína, inibindo a apoptose (SEVRIUKOVA, 2009). Entretanto, quando as coenzimas reduzidas são consumidas, AIF é monomerizado e pode induzir apoptose. Dessa forma, segundo estes dados, o estado metabólico celular, determinado pelas concentrações de NAD(P)H celular pode controlar a função apoptótica do AIF (CHURBANOVA e SEVRIUKOVA, 2008).

2.3 CISTEÍNAS DO AIF

Na sequência madura de AIF estão presentes 3 resíduos de cisteína. Na sequência do AIF de camundongo, eles encontram-se nas posições 255, 316 e 440 (SUSIN et al., 1999). Na sequência do AIF humano, os resíduos de cisteína estão nas posições 256, 317 e 441. Esses resíduos não parecem ser muito reativos e, dentre os 3 resíduos, somente o último está posicionado próximo à superfície (SEVRIUKOVA, 2011), e também apresenta um pKa mais baixo (MARINO, comunicação pessoal). Também, a observação de que quando o hAIF $\Delta 1-120$ recombinante é incubado com *para-chloromercuriphenylsulfonic acid* (pCMPS), um bloqueador de tiol, ocorre a diminuição da atividade apoptótica do AIF (SUSIN et al., 1999; MIRAMAR et al., 2001), o que sugere um papel importante dos resíduos de cisteína na função apoptogênica.

Além disso, recentemente nosso grupo demonstrou que AIF1 é uma das proteínas que interage com a tioredoxina (Trx1), por mecanismo redox. A interação Trx1-AIF1 é intensificada quando as células são incubadas com H_2O_2 (NAKAO et al., 2015). Uma hipótese é que o AIF1 pode ser oxidado a dissulfeto em condições oxidantes e ser reduzido pela Trx1. Essa hipótese é corroborada pelos dados descritos por Apostolova (2006), que mostrou que o AIF é um possível *scavenger* de ERO. Estes dados contrastam com um estudo recente que demonstrou a interação de AIF com Trx1 reduzida (SHELAR et al., 2015). Sob condições de estresse oxidativo, a interação é desfeita, pois a Trx1 é oxidada a dissulfeto e AIF transloca para o núcleo. No núcleo celular, AIF pode novamente interagir com Trx1 nuclear reduzida, e esta interação impede a ação apoptogênica do AIF.

Recentemente, um estudo mostrou que a proteína homóloga de AIF em *C. elegans*, a WAH1, é oxidada a dímeros formando dissulfetos intra e intermoleculares entre algumas das cisteínas presente em sua sequência (LIN et al., 2016). A WAH1, que é importante para a manutenção da fosforilação oxidativa do nemátoda (TROULINAKI et al., 2018), quando dimerizada é capaz de diminuir a atividade de nuclease da CPS-6 (LIN et al., 2016). Esse dado sugere que as cisteínas do AIF também seriam oxidáveis, processo que pode contribuir na sua função.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Acrilamida, agarose, acetonitrila, ácido fórmico, anexina V-FITC, bis-acrilamida, diamida (DA), ditioneitol (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), estaurosporina (ST), iodoacetamida (IAA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tris base, glicina, triton X-100 4',6 diamidino-2-fenil indol (DAPI) e β mercaptoetanol (β ME) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimum Essential Media (MEM) soro fetal bovino (SFB), meio opti-MEM, tripsina-EDTA foram adquiridos da empresa Gibco. Albumina de soro bovino foi adquirido da empresa Inlab. Azul de bromofenol, ácido acético, KCl e KH_2PO_4 foram adquiridos da Merck. Bactérias competentes Novablue e pET28a foram adquiridos da Novagen. Coomassie Brilliant Blue R250 foi adquirido da BRL Life Technologies. Dharmafect Duo Reagent foi adquirido da Dharmacon. Marcador de massas PageRuler Prestained Protein Ladder e filmes autoradiográficos foram adquiridos da Thermo Scientific. Glicerol foi adquirido da Biotec. NaCl foi adquirido da Hexapur. Na_2HPO_4 foi adquirido da Vetec. Membrana de nitrocelulose foi adquirido da GE healthcare. Paraformaldeído foi adquirido da Dinâmica. Tween 20 e reagente de Bradford adquiridos da empresa da Bio-rad. Enzimas Pfu Ultra High Fidelity DNA polymerase AD da Agilent. DpnI foi adquirido de Fermentas. Lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro foi adquirido da Knittel Glass. Lipofectamina 2000 foi adquirido da Invitrogen. SuperSignal West Pico foi adquirido da Pierce. Tripsina Gold foi adquirido da Promega. Os anticorpos utilizados: anti-HA (Y11, sc-805, Santa Cruz), anti-AIF (H300, sc-5586, Santa Cruz), anti-Trx1 (1:1,000, #559969 BD Pharmingen), anti- β actina (A5441, Sigma), anti-HA (C29F4, Cell Signaling), anti-imunoglobulina de camundongo HRP (A4416, Sigma), anti-imunoglobulina de coelho HRP (A0545, Sigma) anti-imunoglobulina coelho-Alexa Fluor 488 (A11008), anti-imunoglobulina coelho-Alexa Fluor 647(A28181) e anti-imunoglobulina camundongo-Alexa Fluor 488 (A11001) da Molecular Probes.

3.2 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES hAIF Δ 1-120 SELVAGEM E MUTADAS E hTRX1

A sequência humana de AIF, sem o peptídeo sinal e de inserção na membrana interna da mitocôndria (hAIF Δ 1-120) e a sequência completa de Trx1 humana clonada no vetor pET28a foram expressas em bactérias BL21 (DE3) e purificadas em tampão nativo (NAKAO et al, 2015). Os plasmídeos pET28a com as mutações hAIF Δ 1-120 C256S, hAIF Δ 1-120 C317S e hAIF Δ 1-120 C441S foram obtidos a partir da subclonagem dos vetores mutados de pCIneo (LO, 2015). Os produtos de PCR de cada mutação com os *primers* de subclonagem (Tabela 1) foram inseridos no vetor pET28a nos sítios EcoRI e Sall. Bactérias quimiocompetentes Novablue foram usadas para selecionar os plasmídeos mutantes subclonados em meio LB ágar com canamicina. As subclonagens foram verificadas por sequenciamento de DNA. As proteínas hAIF Δ 1-120 selvagens e mutadas foram purificadas pela etiqueta N-terminal de hexahistina. A concentração de proteína foi determinada pelo reagente de Bradford.

TABELA 1. PRIMERS PARA SUBCLONAGEM DAS MUTAÇÕES hAIF Δ 1-120 DO VETOR pCIneo PARA pET28a

Primer	Sequência
hAIF EcoRI F	5'- CGGAATTCGAGGAAGTTCCTCAAG ACAAG-3'
hAIF Sall R	5'- CAGGGTCGACTCAGTCTTCATGAA TGTTG-3'

FONTE: A autora (2019).

3.3 OXIDAÇÃO DAS hAIF Δ 1-120 RECOMBINANTES SELVAGEM E MUTADAS

A proteína hAIF Δ 1-120 (10 μ M) foi oxidada com 2 mM de peróxido de hidrogênio ou 0,5 mM diamida por 15 minutos a 37°C em tampão fosfato salino (PBS). As amostras foram imediatamente submetidas em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 10% em condições não redutoras ou redutoras (5% β ME). O gel, com a proporção de 172:1 acrilamida: bis acrilamida, foi usado para melhorar

a separação das proteínas de alta massa molecular. A coloração do gel foi realizada com Coomassie Brilliant Blue R250 (0,025% Coomassie, 40% metanol e 7% ácido acético).

3.3 SDS-PAGE

As amostras, proteína recombinante ou extrato celular, foram misturadas com tampão de amostra (2% SDS, 10% glicerol, 0,05% azul de bromofenol e 50 mM Tris HCl, pH aprox. 6,8) com ou sem 5% β ME, e aquecidas por 5 minutos a 95°C. Em seguida foram separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE com tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % SDS, pH 8,3) com a corrente primeiramente a 15 mA e depois 30 mA até o final da corrida.

3.4 SDS-PAGE REDOX BIDIMENSIONAL

A hAIF Δ 1-120 recombinante foi oxidada com diamida como descrita no item 3.2 e separada por 10% SDS-PAGE, 1 mm, em condição não redutora (5% β ME). A tira de gel foi cortada, reduzida com 0,1 M DTT por 15 minutos a temperatura ambiente e lavada com tampão de corrida. Para prevenir a reoxidação, os tiois foram alquilados com 0,1 M de iodoacetamida por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após duas lavagens, a tira de gel foi colocada horizontalmente sobre o segundo gel de 1,5 mm. O espaço vazio foi completado com agarose 0,5% e azul de bromofenol 0,75%. O marcador de massas foi aplicado em um papel filtro, que foi inserido antes da solidificação da agarose (SCHWARZ e NICKELSEN, 2013). O gel foi corado com Coomassie Blue.

3.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As bandas do gel (~70 kDa e ~170 kDa) foram descoradas (acetonitrila 50% e ácido fórmico 2% em água) e foi feita a alquilação das cisteínas livres com 50 mM de iodoacetamida por 1 hora a 37°C. A digestão foi realizada com tripsina Gold Promega (razão 1 proteína: 20 tripsina) por 17 horas. AIF e BSA foram digeridos nas mesmas condições que as bandas. Os peptídeos foram extraídos usando *stage tips*, liofilizados no SpeedVac e dissolvidos em 0,1% ácido fórmico em acetonitrila. As

amostras foram analisadas por nLC-ESI-MS/MS com descrito (DANTAS et al., 2018). Os dissulfetos foram analisados usando o *software Spectrum Identification Machine for Cross-Linked Peptides* (SIM-XL) (LIMA et al., 2015 and LIMA et al., 2018) com a colaboração do Dr. Emerson Finco Marques.

3.6 INTERAÇÃO ENTRE TRX1 REDUZIDA COM AIF OXIDADO

A Trx humana (100 μ M) foi reduzida com 2 mM de DTT em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. O DTT foi removido com ultrafiltros com *cutoff* de 3 kDa (Amicon-Merck), por centrifugações seriadas trocando o tampão. A hAIF Δ 1-120 (40 μ M) recombinante foi oxidada com 0,5 mM de diamida por 15 minutos a 37°C. A diamida foi retirada com a troca de tampão por centrifugação no Amicon de 30 kDa (Merck Millipore). Em seguida o AIF oxidado ou não (10 μ M) foi incubado com Trx1 reduzida (40 ou 60 μ M) por 15 minutos a 37°C em 50 mM de Tris pH 7,2. A reação foi interrompida com a adição de tampão de amostra. As amostras foram separadas em SDS-PAGE 10% em condições redutoras e não redutoras, em seguida coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250.

3.7 TRATAMENTO OXIDANTE DAS CÉLULAS

Células embrionárias de rim humano (HEK293T) foram cultivadas em MEM com 10% de soro fetal bovino e 50 μ g/mL de gentamicina. As células foram transfectadas usando um protocolo baseado na precipitação de fosfato de cálcio, com os vetores pCIneo AIF-HA, AIF C256S-HA, AIF C371S-HA e AIF C441S-HA (LO, 2015) ou com vetor vazio. Para uma placa de cultivo celular de 60 mm de diâmetro foram usados 4 μ g de plasmídeo para o plasmídeo de AIF-HA selvagem e 5 μ g para os plasmídeos das mutações. Após 48 horas, células foram tratadas com 0,5 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato salino (PBS) (137 mM PBS, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 e 2 mM KH_2PO_4), por 2 horas ou 75 μ M de diamida em PBS por 10 minutos a 37°C. As células foram lavadas e coletadas com tampão de amostra. Parte do extrato celular foi tratada com 5% de beta mercaptoetanol. Todas as amostras foram separadas por eletroforese.

3.8 WESTERN BLOT

Os extratos celulares foram separados em SDS-PAGE, com concentrações variadas de acrilamida, em tampão Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS) e transferidas em membranas de nitrocelulose através de sistema de transferência *semi-dry* (Biorad) em tampão (48 mM Tris, 39 mM glicina, 0,036% SDS, 20% metanol), com 10 V por uma hora. A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado (Molico®) em TBT (120 mM de NaCl, 20 mM de Tris-base) com 0,05% de Tween 20 por uma hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-HA (1:500), anti-AIF (1:1.000), anti-Trx1 (1:1.000) e anti- β actina (1:10.000), diluídos no tampão de bloqueio. Após a incubação *overnight* dos anticorpos primários a 4°C e a incubação de uma hora dos anticorpos secundários, anti-imunoglobulina de camundongo HRP (1:3.000) e anti-imunoglobulina de coelho HRP (1:4.000) por 1 hora a temperatura ambiente, as membranas foram lavadas e a reação foi desenvolvida com o kit SuperSignal West Pico (Pierce). A quimioluminescência foi detectada com filmes auto-radiográficos (Carestream ou Thermo).

3.9 KNOCKDOWN DE TRX1 E SUPEREXPRESSÃO DE AIF EM HEK293T

As células (4×10^5) foram plaqueadas em placas de 35 mm. No dia seguinte, foram duplo transfectadas com 10 nM siGENOME Smart Pool TXN (Cat# M-006340-01, Dharmacon) e 2 μ g pCIneo AIF-HA vector com 4 μ L Dharmafect Duo Reagent em 100 μ L Opti-MEM. O meio de transfecção foi trocado após 24 horas. Após 72 horas de transfecção as células foram submetidas ao tratamento com oxidantes. As células foram coletadas em tampão de amostra e os extratos foram analisados por *Western Blot*.

3.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células HeLa (carcinoma cervical humano) foram cultivadas em meio Dulbecco modified Eagle (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino e 50 μ g/mL gentamicina, em uma estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Células (3×10^4)

foram plaqueadas em lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro. No dia seguinte, as células foram transfectadas com os plasmídeos de interesse com Lipofectamina 2000. Foram usados 0,4 µg de plasmídeo para 0,8 µL de Lipofectamina em 100 µL de opti-MEM, os quais foram adicionados em 500 µL de meio de cultivo sem antibiótico. Esse meio foi trocado após 5 horas e as células foram mantidas em meio de cultivo para superexpressão das proteínas de interesse. Quarenta e oito horas depois da transfecção, as células foram fixadas com 4% paraformaldeído por 20 minutos, bloqueadas com 0,1 M glicina por 10 minutos e então com 5% albumina de soro bovino com 0,1% Triton X-100. Os anticorpos primários, anti-HA (1:500), anti-AIF (1:100) ou anti-Trx1 (1:300), foram incubados a 4°C *overnight*, seguidos de anti-imunoglobulina coelho-Alexa Fluor 488, anti-imunoglobulina coelho-Alexa Fluor 647 e anti-imunoglobulina camundongo-Alexa Fluor 488. As lamínulas foram montadas em lâminas com meio de montagem com DAPI (50% glicerol, 1 µg/mL DAPI em PBS). As imagens foram capturadas com o microscópio multifóton confocal A1 MP+ (Nikon) no CTAF-UFPR.

3.11 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE

Células HEK293T foram transfectadas com plasmídeo pCIneo (AIF-HA; AIF C256S-HA; AIF C317S-HA; AIF C441S-HA). Após 48 horas, elas foram incubadas com estaurosporina 2 µM por 4 horas em meio de cultivo com 0,5% SFB para induzir apoptose. A determinação da apoptose foi realizada com marcação com anexina V-FITC em citometria de fluxo (BD Accuri C6).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

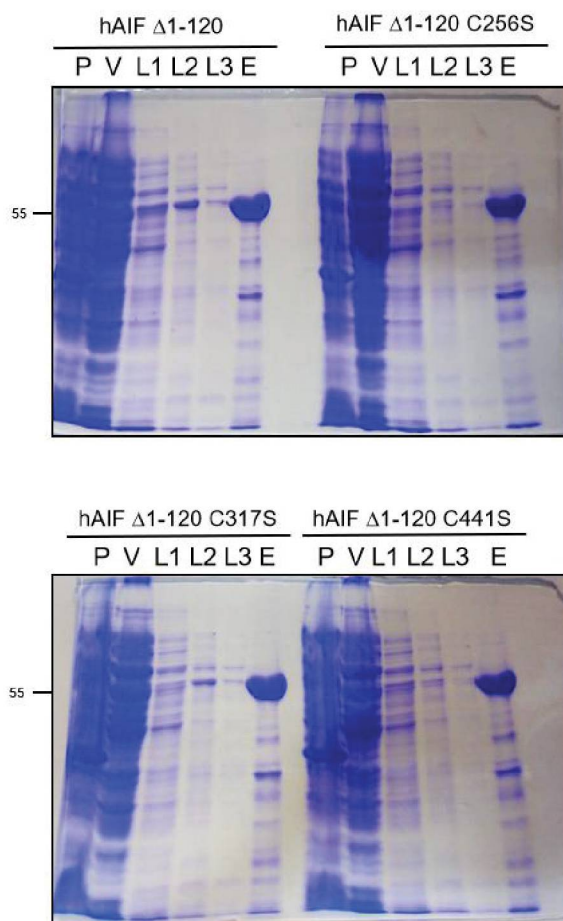
Os dados foram mostrados como média (\pm) e desvio padrão (SD). Para comparação dos valores entre grupos foi utilizado one-way ANOVA com pós-teste de Tukey (Graphpad Software, Prism6). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de P foi menor que 0.05.

4 RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS AIF RECOMBINANTES SELVAGEM E MUTADAS

Para estudar a oxidação das cisteínas do AIF foi utilizada a proteína recombinante produzida em bactérias. Para isso foi necessário obter a proteína AIF selvagem e as proteínas mutadas, com cada resíduo de cisteína substituído por serina. O aminoácido serina possui a mesma estrutura da cisteína, com exceção da cadeia lateral que é um grupo hidroxila (OH) ao invés do tiol (SH). Tendo a proteína selvagem hAIF Δ 1-120 no vetor pET28a utilizado no trabalho prévio do nosso grupo (NAKAO et al., 2015), foram feitas as construções pET28a hAIF Δ 1-120 C256S, pET28a hAIF Δ 1-120 C317S e pET28a hAIF Δ 1-120 C441S.

Com esses vetores, foi realizada a transformação em bactérias BL21 (DE3) e a purificação foi realizada segundo descrito anteriormente (NAKAO et al., 2015). Uma pequena amostra de cada etapa da purificação foi coletada e analisada por SDS-PAGE. Todas as proteínas recombinantes foram purificadas com sucesso e representaram mais de 95% nos eluatos (FIGURA 4). Após a purificação foi verificado que a proteína recombinante foi capaz de incorporar FAD espontaneamente, observado pela cor amarela da proteína purificada (FIGURA 5). A presença do cofator foi confirmada através da absorbância a 450 nm, a média da razão 280 nm/450 nm é de 8.

FIGURA 4. GEL DA PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS hAIF Δ 1-120 SELVAGEM DE MUTADAS

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Gel de cada etapa da purificação das proteínas recombinantes (hAIF Δ 1-120, hAIF Δ 1-120 C256S, hAIF Δ 1-120 C317S e hAIF Δ 1-120 C441S) em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue. P- pellet, V-void, L1- lavagem 1, L2- lavagem 2, L3- lavagem 3, E- eluato.

FIGURA 5. PROTEÍNA RECOMBINANTE HAIF Δ 1-120 PURIFICADA

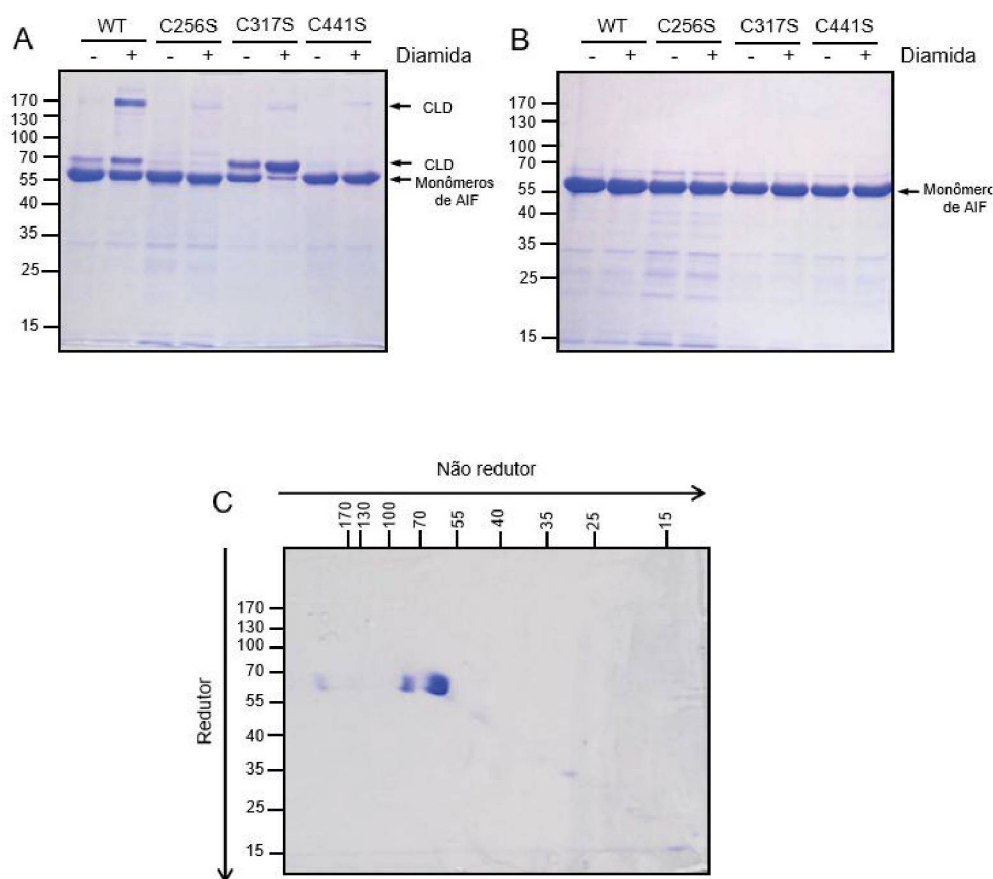
FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Coloração amarela da proteína recombinante da hAIF Δ 1-120 após a purificação, indicando a incorporação espontânea do cofator FAD.

4.2 OXIDAÇÃO DA PROTEÍNA AIF RECOMBINANTE INDUZ A FORMAÇÃO DE CONJUGADOS LIGADOS POR DISSULFETO (CLD)

As proteínas recombinantes obtidas anteriormente foram empregadas para investigar a formação dos dissulfetos da molécula de AIF. Analisando o SDS-PAGE não redutor, o AIF selvagem (WT) apresentou uma forma monomérica (detectada em 58 kDa) e uma banda em 70 kDa (FIGURA 6A). Após a oxidação com 0,5 mM de diamida por 15 minutos, houve um aumento da intensidade da banda de 70 kDa e foi observada uma banda proeminente de massa molecular acima de 170 kDa. Em condições redutoras essas bandas acima da forma monomérica desapareceram, indicando que essas são compostas por hAIF Δ 1-120 ligados por dissulfeto, as quais foram denominados conjugados ligados por dissulfeto (CLD) (FIGURA 6B). A presença da banda de 70 kDa mesmo na condição controle (WT) mostra que o processo de produção e armazenamento da proteína recombinante já leva a oxidação de proteína. A possibilidade desses CLD serem formados por AIF recombinante e proteínas bacterianas provenientes da purificação foi investigada através de um gel bidimensional. Primeiramente, foi feito um gel não redutor seguido de uma corrida redutora mostrando que todos os CLD são apenas de moléculas de hAIF Δ 1-120, pois nenhuma outra proteína foi detectada após a redução (FIGURA 6C).

FIGURA 6. DIAMIDA INDUZ A FORMAÇÃO DE CONJUGADOS LIGADOS POR DISSULFETO EM hAIFΔ1-120



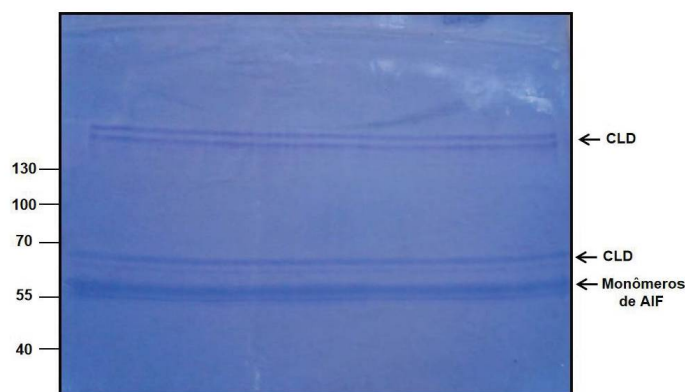
FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: 4,8 µg de recombinante hAIF Δ1-120 selvagem e mutadas hAIF Δ1-120 C256S, hAIF Δ1-120 C317S and hAIF Δ1-120 C441S foram incubados na presença ou ausência de 0,5 mM de diamida por 15 minutos a 37°C, seguido de separação eletroforética por SDS-PAGE (10% de acrilamida) em condições não redutoras (A) ou redutoras (B). Gel redox bidimensional (C) 4,8 µg of µg foi incubado com diamida e submetido a condição não redutora (primeira dimensão). A tira de gel foi cortada e reduzida com 0,1 M de DTT, alquilada com 0,1 M de IAA em tampão de corrida e corrida no segundo gel (segunda dimensão). Os geis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Para identificar as cisteínas envolvidas nos DLC de 70 e 170 kDa, estas bandas foram excisadas do gel (FIGURA 7) e submetidas à digestão com tripsina. Os peptídeos foram separados e analisados por espectrometria de massa. Utilizando-se o *software Spectrum Identification Machine* (SIM-XL) foi identificado um dissulfeto entre os resíduos 256 e 317 (FIGURA 8) na banda de 70 kDa, enquanto dois dissulfetos, entre os resíduos 256 e 317 e entre 256 e 441 (FIGURA 9) foram encontrados nos CLD de 170 kDa (Tabela 2), embora a formação de outros dissulfetos não possa ser descartada. Um gel de maior resolução para proteínas de alta massa revelou que os CLD acima de 170 kDa consistem em duas bandas

distintas (FIGURA 10). A banda que corre mais rápido no gel pode ser um trímero e a que migra mais devagar podem ser tetrâmeros de AIF ligados. Isso seria explicado levando-se em consideração os dados do massa, em que todas as três cisteínas de AIF foram detectadas como oxidáveis, havendo a possibilidade de que cada molécula forme dissulfetos com duas ou mais moléculas.

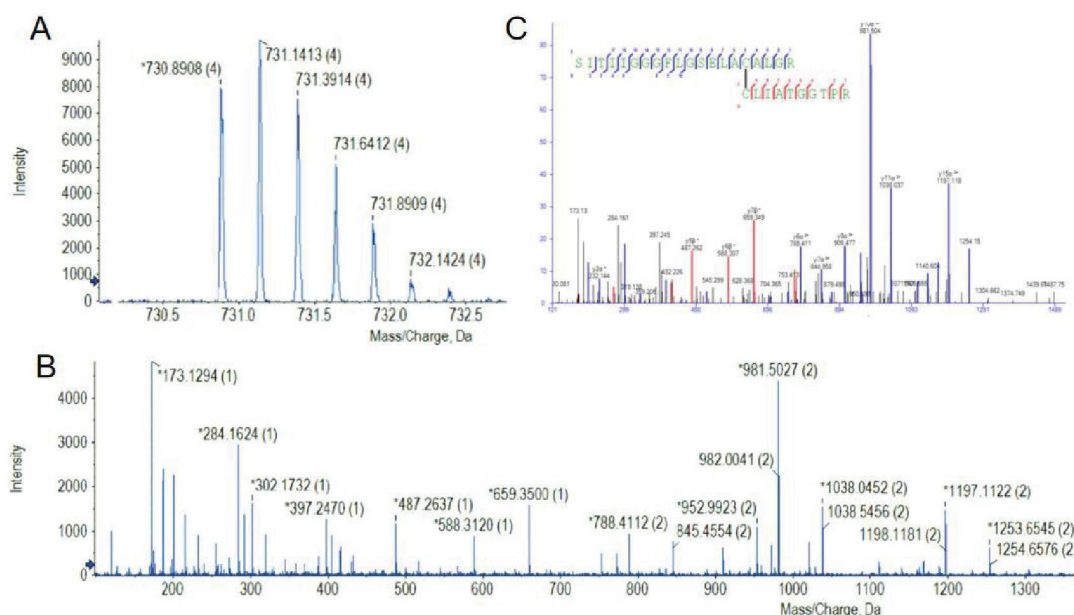
FIGURA 7. SDS-PAGE DE ALTA RESOLUÇÃO DOS CLD PRODUZIDOS DE hAIF Δ 1-120 EXCISADAS PARA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: A proteína recombinante hAIF Δ 1-120 foi oxidada com 0,5 mM de diamida por 15 minutos a 37°C, seguido de separação eletroforética por SDS-PAGE de alta resolução (12% de acrilamida) em condições não redutoras. A amostra foi aplicada em apenas um poço grande para que fossem obtidas grandes quantidades de cada uma das bandas para análise por espectrometria de massas.

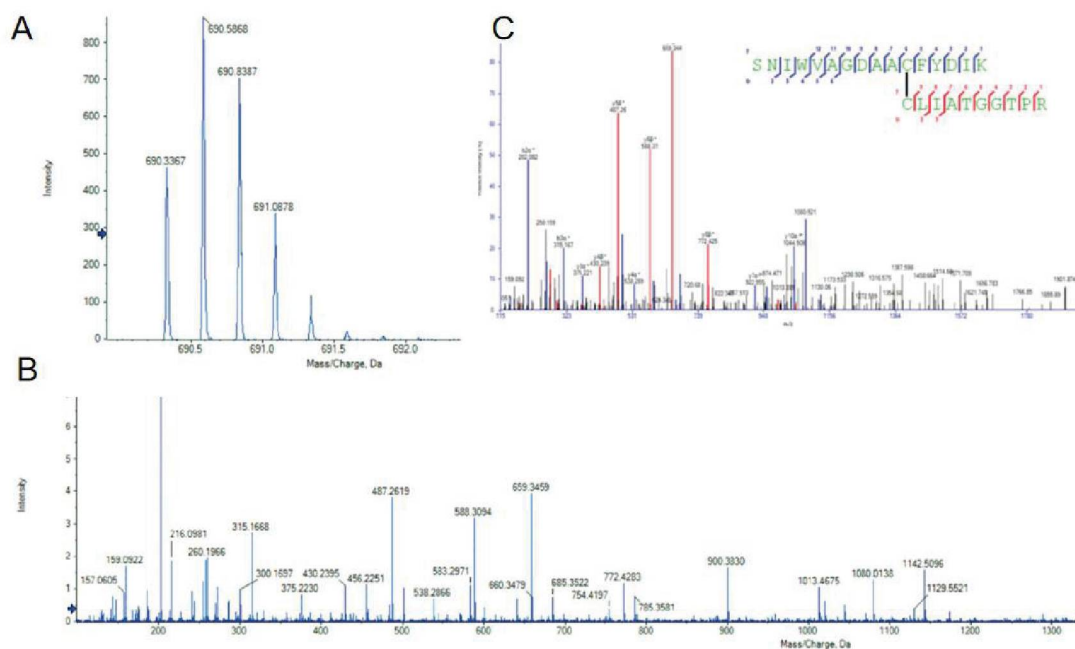
FIGURA 8. IDENTIFICAÇÃO DOS CROSSLINK DE UM DISSULFETO DA AIF ENTRE OS RESÍDUOS 317 E 256



FONTE: Marques (2019).

LEGENDA: (A) Espectro da espectrometria de massas mostrando o padrão de distribuição isotópica da m/z 730.8908 (4+). (B) Espectro MS/MS do peptídeo do cross-link na m/z 730.8908. (C) Resultados do software SIM-XL mostrando formação de cross-link e identificação dos picos de íons. Nesse estudo foi analisado padrão de fragmentação de peptídeos heterodiméricos ligados por dissulfeto derivados da proteína AIF após oxidação com diamida. O espectro mostra características de fragmentação da ponte de dissulfeto. Os íons em azul indicam fragmentos derivados do peptídeo SITIIGGFLGSELA³¹⁷CALGR e íons em vermelho da sequência ²⁵⁶CLITATGGTPR.

FIGURA 9. IDENTIFICAÇÃO DOS CROSSLINK DE UM DISSULFETO DA AIF ENTRE OS RESÍDUOS 441 E 256



FONTE: Marques (2019).

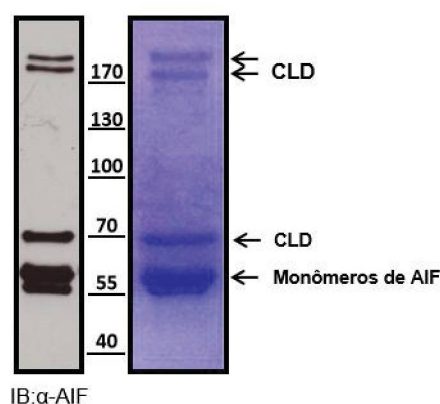
LEGENDA: (A) Espectro da espectrometria de massas mostrando o padrão de distribuição isotópica da m/z 690.3367 (4+). (B) Espectro MS/MS do peptídeo do cross-link na m/z 690.3367. (C) Resultados do software SIM-XL mostrando formação de cross-link e identificação dos picos de íons. Nesse estudo foi analisado padrão de fragmentação de peptídeos heterodiméricos ligados por dissulfeto derivados da proteína AIF após oxidação com diamida. O espectro mostra características de fragmentação da ponte de dissulfeto. Os íons em azul indicam fragmentos derivados do peptídeo SNIWVAGDAA⁴⁴¹C FYDIK e íons em vermelho da sequência ²⁵⁶CLIATGGTPR.

TABELA 2. IDENTIFICAÇÃO DO RESÍDUO DE CISTEÍNA OXIDADO NOS FRAGMENTOS DE hAIF Δ 1-120 DIGERIDOS POR TRIPSINA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Banda	Peptídeo ligados por dissulfeto dos fragmentos de AIF digeridos por tripsina	Ligação C-C	m/z Calculada	m/z Observada	Erro ppm
~70 kDa	² ⁵ ⁶ C L I A T G G T P R - SITIIGGGFLGSELA ³¹⁷ CALGR ^a	C256-C317	730.8900 (4+)	730.8895 (4+)	0.7
~170 kDa	² ⁵ ⁶ C L I A T G G T P R - SITIIGGGFLGSELA ³¹⁷ CALGR ^a	C256-C317	730.8900 (4+)	730.8908 (4+)	1.1
	² ⁵ ⁶ C L I A T G G T P R - SNIWVAGDAA ⁴⁴¹ C FYDIK ^b	C256-C441	690.3386 (4+)	690.3367 (4+)	2.7

FONTE: Marques (2019).

FIGURA 10. SDS-PAGE DE ALTA RESOLUÇÃO DOS CLD PRODUZIDOS DE hAIF Δ 1-120



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: 17,5 μ g of AIF oxidado com 0,5 mM diamida por 15 minutos a 37 °C foram separados com alta resolução 12% SDS-PAGE (acrilamida:bis acrilamida 172:1). O gel foi corado Coomassie Brilliant Blue R-250 (Direita) ou proteína foi transferida para membrana de nitrocelulose e incubada com anti-AIF (1:1000).

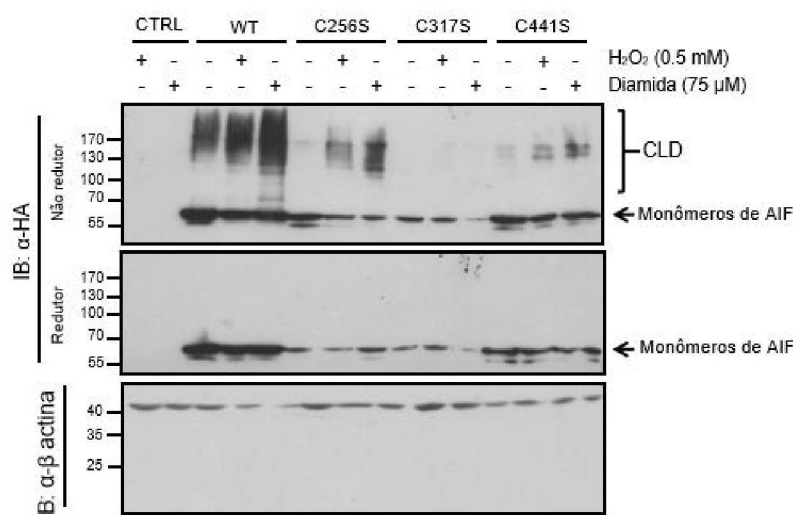
Os três resíduos de cisteínas presentes na sequência primária da AIF humana estão localizados nas posições 256, 317 e 441. Para analisar quais deles participam das pontes dissulfeto observadas, foram usadas as proteínas recombinantes com mutação de cada resíduo de cisteína para serina hAIF Δ 1-120 C256S, C317S e C441S. Após a incubação com diamida, a produção do CLD de 170 kDa foi severamente afetada por todos os mutantes confirmando os dados da espectrometria de massas, que mostrou que as 3 cisteínas da AIF participam da formação de dissulfeto (FIGURA 6A e 6B). A substituição das cisteínas 256 e 441 por resíduos de serina impediu completamente a formação dos CLD de 70 kDa, na ausência e na presença de oxidantes. Esse resultado confirma que a cisteína 256 está envolvida no CLD de 70 kDa, e indica que a cisteína 441 também tem participação, entretanto esse dissulfeto não foi detectado pela espectrometria de massas. O mutante C317S apresentou um comportamento peculiar. Mesmo na ausência de oxidante, essa mutação levou a um aumento na quantidade de CLD de 70 kDa, que se tornou mais proeminente após a oxidação com diamida. No entanto, a análise por espectrometria de massas não detectou a cisteína 317 oxidada no CLD de 70 kDa. Por isso, esse achado pode sugerir que a mutação C317S leva a uma modificação estrutural na proteína recombinante, o que pode levar ao aumento da reatividade dos resíduos de cisteínas remanescentes. Todos esses dados indicam que as 3 cisteínas participam das ligações de dissulfeto na hAIF Δ 1-120, formando CLD com massa molecular aparente de 70 kDa e 170 kDa.

4.3 AIF FORMA CONJUGADOS LIGADOS POR DISSULFETO EM HEK293T

Para verificar se os resultados *in vitro* ocorrem em um sistema mais biológico, células HEK293T foram transfectadas com AIF selvagem, com uma etiqueta de hemaglutinina de influenza humana (HA). Essas células foram incubadas com 0,5 mM peróxido de hidrogênio por duas horas ou com 75 μ M diamida por 10 minutos. O *western blot* com anti-HA mostra que em condições não redutoras, na condição sem oxidantes, aparecem conjugados de AIF-HA com massa molecular maior do que 100 kDa, além da banda monomérica de aproximadamente 62 kDa (FIGURA 11). Esse padrão de conjunto de bandas detectado indica que os CLD são resultado da reação de AIF-HA com grande quantidade de proteínas celulares. A

detecção dos CLD na condição sem tratamento com oxidantes sugere que existe um metabolismo basal celular que induz a formação de CLD de AIF-HA.

FIGURA 11. AIF FORMA CONJUGADOS LIGADOS POR DISSULFETO (CLD) EM MODELO CELULAR



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Células HEK293T foram transfectadas com vetor vazio (pCIneo) ou vetores codificando AIF-HA, AIF C256S-HA, AIF C317S-HA ou AIF C441S-HA. Quarenta e oito horas após a transfecção, foram incubadas com 0,5 mM de peróxido de hidrogênio por duas horas ou 75 μM de diamida por 10 minutos a 37°C. Extrato total foi separado por SDS-PAGE 10% em condições não redutoras e redutoras, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com os anticorpos indicados. Figura representativa de n=3

Em seguida, para confirmar o papel de cada cisteína na formação dos CLD, as células foram transfectadas com os vetores mutantes pCIneo AIF C256S-HA, AIF 317S-HA e AIF C441S-HA e submetidas aos mesmos estímulos oxidantes da AIF-HA selvagem. A expressão das proteínas de AIF mutadas é menor comparada com a selvagem, sugerindo que essas mutações interferem na expressão da proteína ou em sua estabilidade. Para resolver este problema, as células foram transfectadas com uma quantidade maior de plasmídeo de AIF mutado. Considerando a quantidade relativa entre os CLD e monômero de AIF-HA, a substituição dos três resíduos de cisteína comprometeu severamente a formação de CLD em condições basais (FIGURA 11). Após a oxidação, o AIF-HA C256S demonstrou uma quantidade reduzida de CLD que AIF-HA, enquanto que quase não houve a formação desses nos AIF-HA C317S e AIF-HA C441S (FIGURA 11). Assim como no AIF-HA selvagem, os CLDs não foram detectados em condições redutoras. Esses

dados confirmam que as três cisteínas da AIF têm um papel na formação de dissulfetos em células.

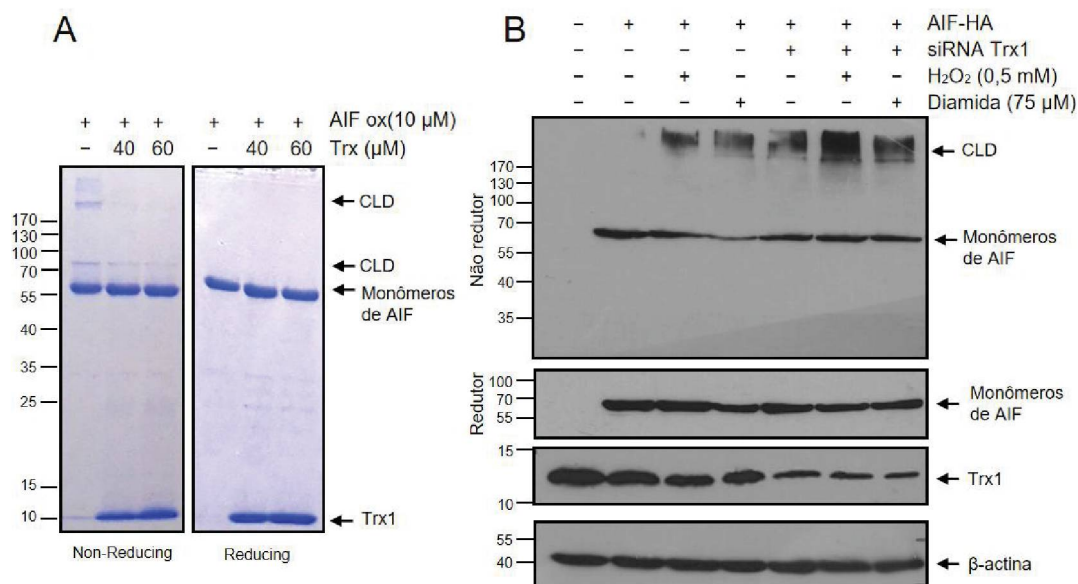
No geral, os dados em modelo de superexpressão de AIF-HA em células humanas condizem com os achados nas proteínas recombinantes. Assim como AIF-HA aparenta estar oxidado em condições basais, a proteína recombinante hAIF Δ 1-120 também é purificada parcialmente oxidada. A presença de oxidante induz a formação dissulfetos formando CLD de aproximadamente 70 kDa e acima de 100 kDa em células e 70 kDa e 170 kDa em recombinantes. As mutações C256S e C441S afetaram severamente o aparecimento dos CLD tanto nas células quanto nas recombinantes, mostrando sua participação na formação dos dissulfetos. A mutação C317S leva a uma resposta diferente na recombinante, o que pode refletir na sua menor expressão nas células. Caso realmente seja uma alteração conformacional, essa proteína pode ser degradada nas células e por isso a expressão da mesma é menor em comparação a todas as outras. Essa mutação também afeta o aparecimento de CLD nos dois modelos, por isso todos os dados corroboram os achados por espectrometria de massas, demonstrando que todas as cisteínas são oxidáveis e são capazes de formar ligações dissulfídicas.

4.4 PAPEL DA TRX1 NA REDUÇÃO DOS CLD DO AIF

O próximo passo foi investigar a redução dos dissulfetos dos CLD do hAIF Δ 1-120 produzidos por diamida. A Trx1 é uma proteína dissulfeto redutase e resultados do nosso grupo e de outros mostraram que AIF1 interage com Trx1. A incubação de 10 μ M de hAIF Δ 1-120 oxidada com 40 μ M de Trx1 humana recombinante levou ao desaparecimento da banda de 170 kDa e diminuição da quantidade da banda de 70kDa (FIGURA 12A). A incubação com 60 μ M de Trx1 levou ao completo desaparecimento de ambos os CLD (FIGURA 12A). Essa concentração alta de Trx1 foi empregada pela ausência do sistema regenerativo (tioredoxina redutase 1/NADPH). Esses resultados mostram que a Trx1 pode reduzir as pontes dissulfeto na hAIF Δ 1-120. Em seguida, para analisar os efeitos de Trx1 nos CLD em células, as HEK293T foram transfectadas com siRNA de Trx1 e pCIneo AIF-HA e tratadas com os oxidantes. As células com menor nível de Trx1 endógeno apresentaram maiores quantidades de CLD de AIF em ambas condições

basais e oxidantes (FIGURA 12B). Esse resultado indica que a Trx1 é relevante para o sistema antioxidante, como um antioxidante direto ou como um redutor dos CLD.

FIGURA 12. TRX1 TEM UM PAPEL NA REDUÇÃO DE CLD DA AIF



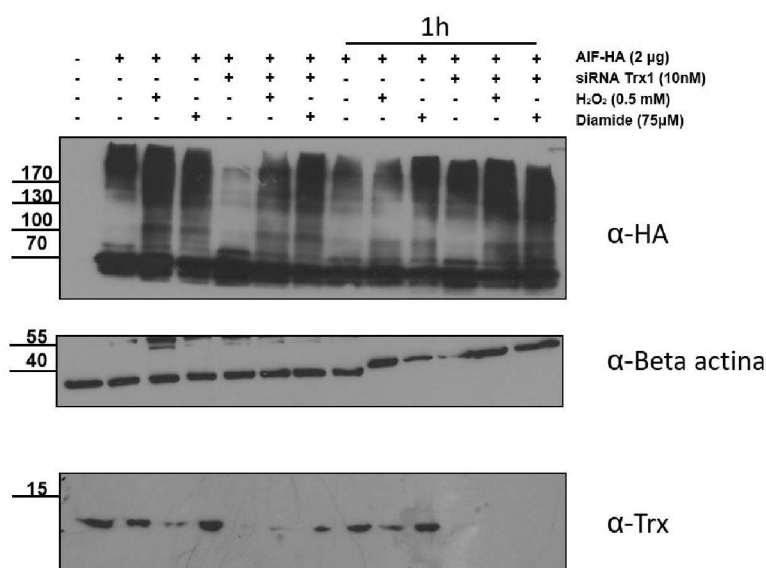
FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: (A) hAIF Δ1-120 (10 μM) foi incubado com 0,5 mM de diamida por 15 minutos a 37°C. A Trx1 recombinante humana (40 μM) foi incubada com (40 μM) por mais 15 minutos a 37°C. As amostras foram separadas em SDS-PAGE 10% em condições redutoras e não redutoras. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) Células HEK293T foram transfectadas com 2 μg de vetor AIF-HA e 10 nM de siRNA Trx1 ou com siRNA controle e tratadas com 0,5 mM peróxido de hidrogênio por duas horas ou 75 μM de diamida por 10 minutos. O extrato total de proteína foi separado por SDS-PAGE de 12% e 15% em condições não redutoras e redutoras, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubada com os anticorpos indicados.

Para confirmar a hipótese de que a Trx1 seja redutora direta dos CLD do AIF-HA, foi repetido o mesmo ensaio da figura 12B, porém após o estímulo oxidante uma parte das células passaram por uma hora de recuperação com meio de cultivo. O esperado era que, nesse período, as células que possuem o sistema antioxidante funcional, sem silenciamento de Trx1, fossem capazes de reduzir a quantidade de CLD de AIF-HA; enquanto nas células com menor quantidade de Trx1 era esperado que fosse mantida a quantidade de CLD, mesmo após essa hora de recuperação. Quando comparado com o controle sem oxidante de cada condição, observou-se que as oxidações aumentaram a quantidade de CLD em todas as condições. Com silenciamento de Trx1 a quantidade de CLD é maior. No entanto, não foi possível

observar nenhuma diferença significativa nas quantidade dos CLD após 1 hora de recuperação (FIGURA 13).

FIGURA 13. QUANTIDADE DE CLD EM CÉLULAS COM SILENCIAMENTO DE TRX1 E COM RECUPERAÇÃO



FONTE: A autora (2019).

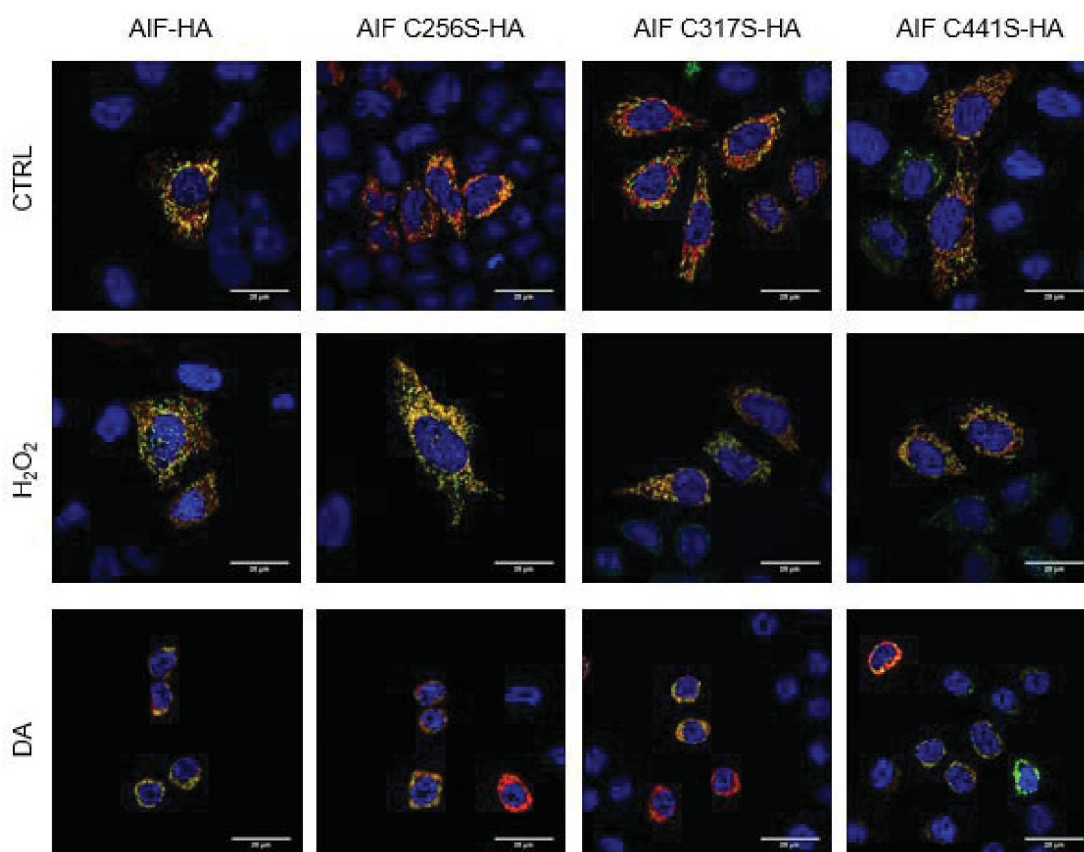
LEGENDA: Células HEK293T foram transfectadas com 2 µg de vetor AIF-HA e 10 nM de siRNA Trx1 ou com siRNA controle e tratadas com 0,5 mM peróxido de hidrogênio por duas horas ou 75 µM de diamida por 10 minutos. O extrato total de proteína foi separado por SDS-PAGE de 12% e 15% em condições não redutoras e redutoras, transferido para membrana de nitrocelulose e incubado com os anticorpos indicados. n=3

4.4 INTERAÇÃO DE AIF-TRX1

Um fato intrigante é que AIF é uma proteína mitocondrial e a Trx1 está localizada predominantemente no citosol. Portanto primeiramente foi investigado se a superexpressão de AIF-HA provoca uma localização aberrante. Para isso, as AIF-HA selvagem e mutadas foram superexpressas em células HeLa para determinar suas localizações. Os resultados de imunofluorescência confirmaram a expressão mitocondrial de todas as proteínas AIF-HA (FIGURA 14). Os efeitos oxidantes também foram avaliados para analisar se ocorre a alteração de localização de AIF. Em todas as células com superexpressão, independente da construção transfectada, os oxidantes não alteraram a marcação mitocondrial da proteína estudada. Foi observado que 0,5 mM de peróxido de hidrogênio por duas horas de tratamento induziu fragmentação mitocondrial e 75 µM de diamida por 10 minutos de tratamento induziu a formação de *blebs* na membrana, um sinal característico de apoptose. No

entanto, nenhuma translocação ao núcleo foi observada, possivelmente devido ao curto tempo de tratamento. Interessantemente, a formação de CLD não afetou a localização mitocondrial nas células, assim como observado pelas imunofluorescências.

FIGURA 14. LOCALIZAÇÃO MITOCONDRIAL DE AIF-HA, AIF C256S-HA, AIF C317S-HA E AIF C441S-HA SUPEREXPRESSOS EM CÉLULAS HELA



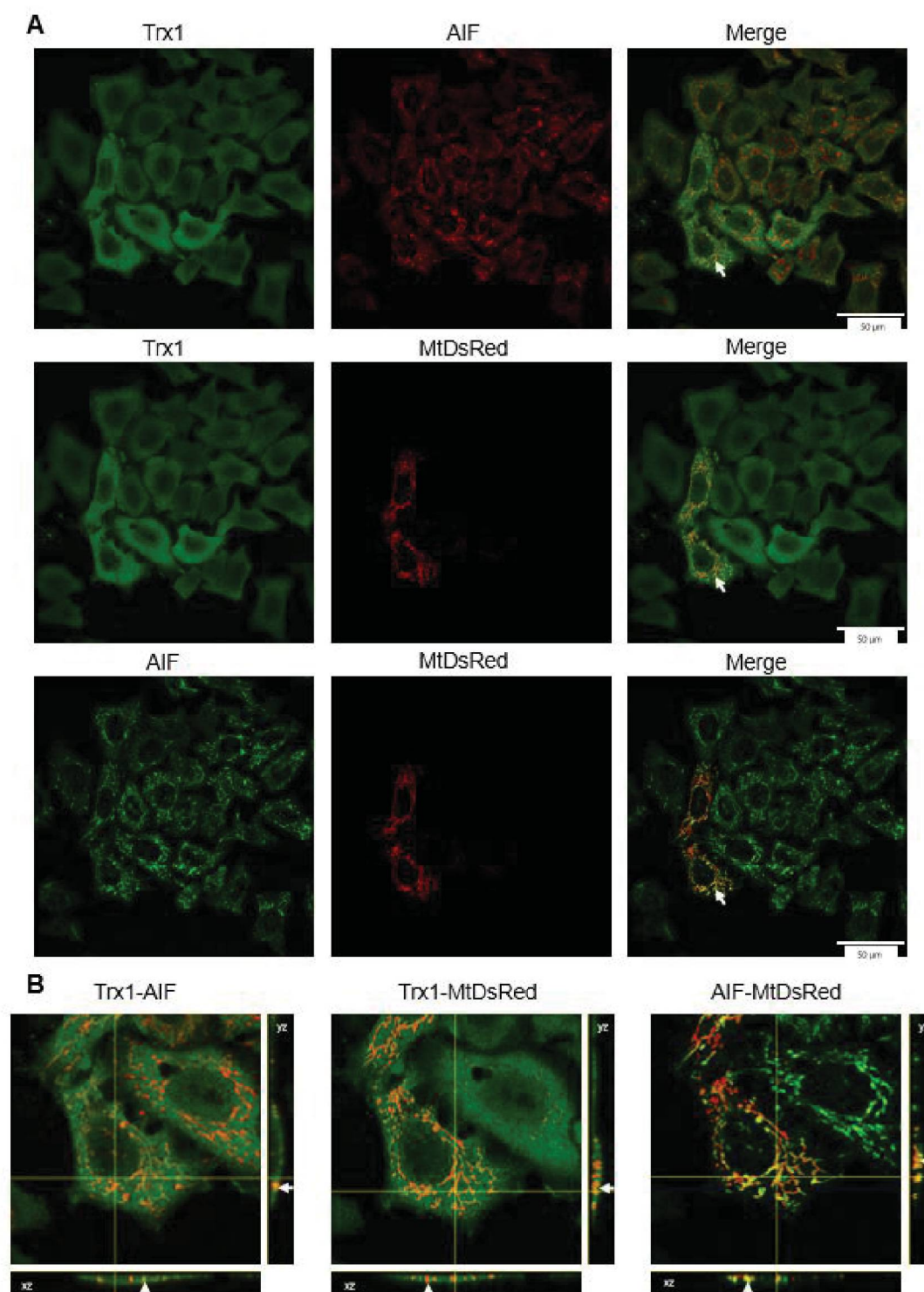
FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos correspondentes e com o plasmídeo pCDNA 3-MtDsRed, para marcar a mitocôndria. Quarenta e oito horas depois, foram tratadas ou não com 0,5 mM de peróxido de hidrogênio por duas horas ou 75 μ M de diamida por 10 minutos a 37°C. Após a fixação, as células foram marcadas com anticorpo anti-HA e anti-coelho-Alexa Fluor 488 e montados com DAPI. Imagem representativa de n=3.

Posteriormente foi investigado se Trx 1 poderia ser encontrada na mitocôndria. Vários trabalhos têm demonstrado a presença de proteína redox citosólicas na mitocôndria, como a homóloga fosfatase e tensina no cromossomo dez (PTEN) (Shen et al., 2015) e glutathione peroxidase 3 (Gpx3) (KRITSILIGKOU et al., 2017). Portanto, foi realizado ensaio de imunofluorescência para investigar a presença de Trx1 na mitocôndria e sua colocalização com AIF. Como o esperado,

AIF foi detectado com padrão mitocondrial, enquanto a Trx1 apareceu predominantemente no citosol. Entretanto, análise nos planos confocais revelaram um pequena fração de Trx1 colocalizada com AIF, mostrando uma localização mitocondrial (FIGURA 15). Assim, esses dados indicam que Trx1 celular está presente na mitocôndria e é nesse local que ela interage com AIF.

FIGURA 15. LOCALIZAÇÃO MITOCONDRIAL DE TIORREDOXINA 1



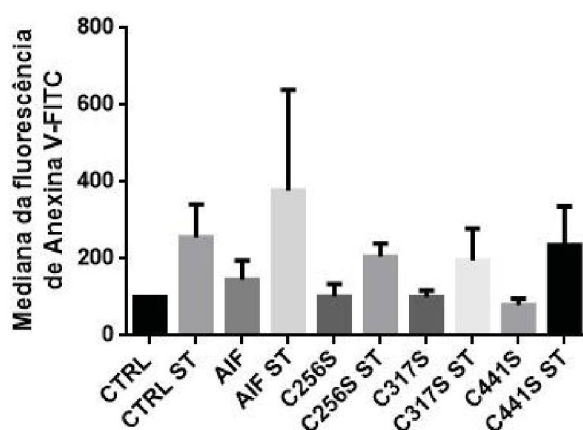
FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Células HeLa foram transfectadas com plasmídeo pCI-neo Trx-HA e pcDNA 3-MtDsRed, para marcar a mitocôndria. Quarenta e oito horas depois, as células foram fixadas e incubadas *overnight* com anticorpos anti-Trx1 e anti-AIF seguidos por anti-IgG coelho-Alexa Fluor 488 e anti-IgG camundongo-Alexa Fluor 647, respectivamente. (A) localização citoplasmática e mitocondrial de Trx1 e sua colocalização com AIF ou marcação fluorescente da proteína MtDsRed na mitocôndria. (B) Visão ortogonal amplificada dos planos XZ e YZ das imagens mostradas em A. As setas indicam regiões de colocalização de Trx1 com AIF ou mitocôndria. Escala: 50 µm.

4.5 CISTEÍNAS DA AIF E FUNÇÃO APOPTÓTICA

Por ter participação conhecida na apoptose e pelo trabalho de Miramar e colaboradores (2001) ter indicado que o bloqueio dos tiois reduz a atividade apoptogênica de AIF, foi avaliada a apoptose de células superexpressando AIF-HA e os mutantes AIF C256S-HA, AIF C317S-HA e AIF C441S-HA. Normalizando com o controle, células transfectadas com vetor vazio sem estímulo apoptótico (CTRL), todas as células tratadas com estourosporina apresentaram aumento da marcação de apoptose, medida pela mediana na fluorescência da anexina V-FITC. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença significativa, comparando-se a razão da mediana das células induzidas a apoptose e seu controle, entre as células que possuíam a proteína selvagem ou as mutadas de cisteína (FIGURA 16). Há possibilidade de a diferença esteja mascarada pela presença do AIF endógeno. Por isso esse ensaio foi repetido com silenciamento da proteína endógena (Dado não mostrado), porém mesmo assim não foi possível determinar de que modo as cisteínas do AIF afetam a sua função apoptótica.

FIGURA 16. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM CÉLULAS HEK293T SUPEREXPRESSANDO AIF-HA E MUTANTES



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Células foram transfectadas com plasmídeo pCIneo AIF-HA, AIF C256S-HA, AIF C317S-HA, AIF C441-HA ou vetor vazio. Após 48 horas, as células foram expostas ao estímulo apoptótico, estourosporina (ST) por quatro horas, e marcadas com anexina V-FITC. A mediana da fluorescência foi obtida por citometria de fluxo. n=3

5 DISCUSSÃO

Combinando os modelos *in vitro* e celular, foi demonstrado que os tiois das cisteínas do AIF podem ser oxidados a dissulfeto, produzindo CLD reversíveis. Em células HEK293T, a grande quantidade de CLD com massa molecular de ~120 a ~170 kDa e a banda menos proeminente de aproximadamente 70 kDa após a incubação com diamida indica que AIF é suscetível a formação de dissulfetos com proteínas celulares mesmo na ausência de oxidantes exógenos. Para explorar mais detalhadamente a formação de dissulfetos nas moléculas de AIF, a recombinante hAIF Δ 1-120 foi utilizada. Embora o uso de proteínas recombinantes seja uma ferramenta simples, as proteínas AIF recombinantes têm mostrado alterações na reatividade redox (dependente de sua ligação com a NAD(P)H), determinada pela sua sequência N-terminal e sua capacidade de dobramento natural e ligação com FAD (CHURBANOVA e SEVRIUKOVA, 2008). A hAIF Δ 1-120 utilizada foi capaz de ligar-se ao FAD espontaneamente, mostrado pela coloração amarela da solução eluída da coluna de purificação, indicando que estava naturalmente dobrada e que mantinha as propriedades fisiológicas. Entretanto, esses resultados devem ser interpretados cautelosamente, pois é uma forma citosólica truncada e não a forma nativa presente no espaço intermembranas (Δ 1-53) (OTERA et al., 2005). Os resultados *in vitro* confirmam que hAIF Δ 1-120 pode ser oxidado por diamida produzindo dois CLD, com massa molecular estimada de 70 kDa e 170 kDa, envolvendo os 3 resíduos de cisteína. Entretanto, não foi possível determinar o número de moléculas de AIF no *crosslink*. Um estudo recente mostrou que a homóloga de AIF em *C. elegans* WAH1 também é capaz de ser oxidada a um dímero ligado por dissulfeto. A WAH1 monomérica é uma proteína de 60 kDa que contém 6 resíduos de cisteína, e é essencial para a manutenção correta da fosforilação oxidativa em *C. elegans*, similarmente ao AIF de mamíferos (TROULINAKI et al., 2018). Sob estímulo oxidante de peróxido de hidrogênio, produz um dímero ligado por dissulfeto, que corre eletroforicamente como uma banda de aproximadamente 170 kDa (LIN et al., 2016). Os dados de espectrometria de massa identificaram 3 dissulfetos nesse dímero de WAH1: dissulfeto intermolecular entre os resíduos C345 e dissulfetos intra e inter moleculares entre C345-C240. Também foi detectado um monômero oxidado que corre com a mesma massa molecular que o monômero reduzido. Os resíduos de cisteínas envolvidos no

dissulfeto intramolecular do monômero são os mesmos envolvidos nos dissulfetos dos dímeros, indicando que esses resíduos são os mais reativos na WAH1 (LIN et al., 2016). Esses achados, assim como nossos dados, indicam que os três resíduos de AIF/WAH1 são oxidados a dissulfetos, produzindo CLD *in vitro*. Baseado nas massas moleculares aparentes, sugere-se que o CLD de 170 kDa seja formado por 3 ou 4 moléculas de hAIF Δ 1-120. A caracterização do CLD de 70 kDa também é desafiadora, pois 70 kDa é bem menor que a massa molecular esperada para um dímero, a não ser que possua mais de uma ponte de dissulfeto levando a uma conformação mais compacta e uma migração eletroforética mais rápida.

O impacto fisiopatológico dos CLD não foi investigado, porque as células são equipadas com proteínas que processam o peróxido de hidrogênio (WINTERBOURN, 2013), e pelos resíduos de cisteína do AIF, exceto pelo C441, não serem expostos ao solvente (SEVRIUKOVA, 2011) por isso é improvável que AIF tenha função direta de destoxificar o peróxido de hidrogênio. Sua oxidação a CLD pode ser resultado da produção excessiva de oxidantes. O peróxido de hidrogênio é um oxidante fisiológico, produzido em vários locais da célula, especialmente na mitocôndria. No estado oxidado, as funções fisiológicas de AIF provavelmente estariam modificadas. Por exemplo, AIF tem se mostrado crucial para a importação de CHCHD4 para mitocôndria (HANGEN et al., 2015; MEYER et al., 2015), e sua interação com a CHCHD4 depende da conformação da AIF (HANGEN et al., 2015). Portanto, a oxidação de AIF a CLD pode diminuir a disponibilidade de AIF funcional. Nesse contexto, uma perspectiva interessante que surgiu nesse estudo é de que Trx1 possa ser relevante para o controle do conteúdo de CLD em células, pois os níveis celulares menores de Trx1 levaram a uma detecção maior do conteúdo de CLD produzidos por peróxido de hidrogênio e diamida. A interpretação mais óbvia desses resultados é que Trx1 reage diretamente com os oxidantes, prevenindo a oxidação de AIF. Alternativamente, isso sugere que Trx1 é relevante na redução dos CLD. De fato, a recombinante de Trx1 reduzida foi capaz de desfazer os CLD produzidos pela diamida em hAIF Δ 1-120. No geral, esse resultado é consistente com os achados prévios mostrando que Trx1 interage com AIF em modelos celulares. AIF liga-se a Trx1, com uma interação envolvendo a cisteína nucleofílica do domínio CxxC de Trx1 e é aumentada por peróxido de hidrogênio (NAKAO et al., 2015), e também envolvendo dois resíduos de cisteína da molécula de AIF (SHELAR et al., 2015). Interessantemente, a interação entre AIF e Trx1 é

interrompida com concentrações subletais de peróxido de hidrogênio e diamida, mas aumenta durante o período de recuperação (SHELAR et al., 2015), indicando o papel da Trx1 na restauração do *status* redox de AIF. Similarmente, nossos dados revelaram alguns pontos de colocalização de Trx1 com o marcador mitocondrial, confirmando os achados de proteômica em que a Trx1, juntamente com a tiorredoxina redutase 1, estão presente no EIM de leveduras (VÖGTLE, et al., 2012). Uma vez que foi detectado CLD nas células em condições basais, seria importante estrategicamente manter uma pequena fração de Trx1 celular na mitocôndria. Além da Trx1, outras proteínas redox citosólicas também têm sido encontrados na mitocôndria, especialmente no espaço intermembranas (KRITSILIGKOU et al., 2017), o que indica que o espaço intermembranas mitocondrial é um ambiente redox importante (CARDENAS-RODRIGUEZ e TOKATLIDIS, 2017). Infelizmente não foi possível determinar a influência dos resíduos de cisteína na função apoptótica de AIF no presente estudo, apesar de indícios na literatura de que o bloqueio de tiol afeta essa atividade (MIRAMAR et al., 2001). No entanto, estudos futuros podem avaliar tanto a importância dessas cisteínas quanto a forma oxidada de AIF (CLD), na atividade apoptótica induzida pela AIF e também suas funções fisiológicas.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que os três resíduos de cisteínas, C256, C317 e C441, do AIF humano podem ser oxidados formando dissulfetos, tanto na proteína recombinante quanto na proteína superexpressa em células humanas. Em modelo celular a oxidação com peróxido de hidrogênio e diamida produz CLD entre moléculas de AIF ou com outras proteínas celulares, enquanto essa oxidação só é observada com diamida no modelo *in vitro*. Os CLD podem ser reduzidos pela Trx1, a qual é encontrada em pequenas quantidades na mitocôndria.

CAPÍTULO II

Caracterização inicial de C5orf63 e YDR286C

1 INTRODUÇÃO

O oxigênio é substrato indispensável para o metabolismo e as ERO são subprodutos inevitáveis da respiração aeróbica. No entanto, é necessário que haja uma regulação dessa quantidade de ERO liberadas. Em pequenas quantidades podem participar de processos como sinalização celular, regulando processos fisiológicos importantes, como proliferação, adesão, diferenciação e motilidade celular. Mas quando em excesso os ERO levam ao estresse oxidativo que promove danos às macromoléculas, podendo resultar e agravar patologias. Para isso as células são equipadas com sistemas de defesa antioxidante, equilibrando as quantidades de oxidantes nas células. Os dois sistemas antioxidantes mais conhecidos são a tioredoxina e a glutationa. O mecanismo de defesa promovido por esses sistemas resulta de reações de oxidação-redução para equilibrar a quantidade de oxidantes dentro da célula.

Tendo em vista o quão importante são as proteínas redox, é importante caracterizar novas proteínas com funções redox, o que poderia desvendar mais como funcionam esses mecanismos de defesa antioxidante nas células ou outras funções que dependam de reações de oxidação-redução. Existem várias proteínas que ainda não possuem funções determinadas, mas previsões comparando sequências e estruturas com sítios-ativos de proteínas redox conhecidas permitem a previsão de novas proteínas com função similar. Por isso, o presente estudo visou caracterizar as proteínas C5orf63 de *Homo sapiens* e sua homóloga em *Saccharomyces cerevisiae* YDR286C.

1.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a proteína humana C5orf63 e YDR286C de levedura.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

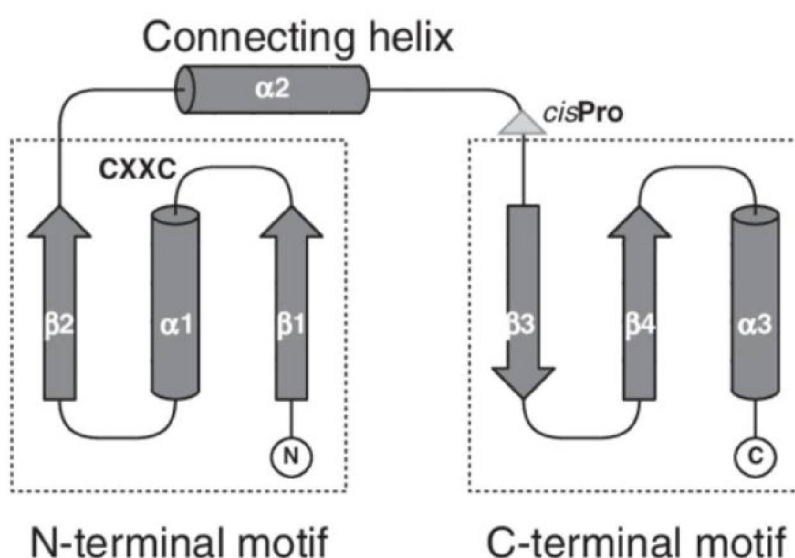
- Analisar a estrutura primária e os domínios de C5orf63 e YDR286C;
- Determinar atividade e características da C5orf63 recombinante;
- Determinar localização celular de C5orf63 e YDR286C;
- Analisar o fenótipo em leveduras com deleção do gene YDR286C;
- Buscar proteínas-alvo de YDR286C.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUPERFAMÍLIA TIORREDOXINA

A superfamília tiorredoxina é composta por proteínas tiol oxidoredutases, que catalisam reações de formação, reversão e isomerização de pontes de dissulfeto (CARVALHO et al., 2006). As tiorredoxinas, glutarredoxinas, proteínas dissulfeto isomerases são as integrantes mais conhecidas dessa superfamília. A atividade dessas proteínas desempenha papel antioxidante nas células, mas também são importantes para dobramento oxidativo de proteínas, sinalização celular e entre outros (CARVALHO et al., 2006). A principal característica estrutural das proteínas dessa família são a presença de um motivo CxxC. Além disso, a presença da estrutura secundária composta pelo N-terminal de $\beta\alpha\beta$ e C-terminal de $\beta\beta\alpha$ conectado por uma α -hélice. O motivo CxxC localiza-se na superfície da proteína e precede a primeira α -hélice do N-terminal, característica essencial para sua atividade redox (HOLMGREN, 1995; COLLET e MESSENS, 2010). Essas características estruturais são comuns aos membros da superfamília da tiorredoxina e é denominada dobramento tiorredoxina (FIGURA 17).

FIGURA 17. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO DOBRAMENTO TIORREDOXINA



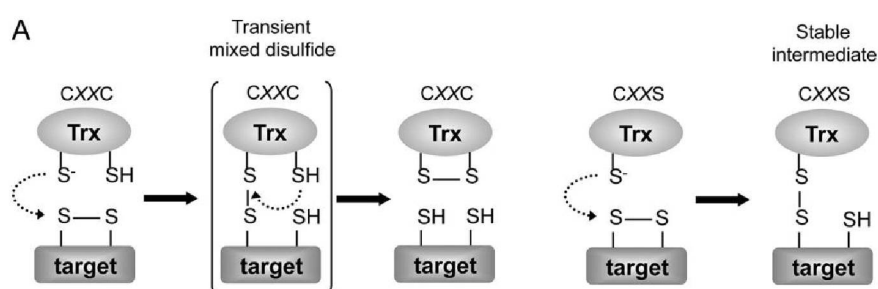
FONTE: Shouldice (2011)

LEGENDA: Esquema representando a estrutura secundária do dobramento tiorredoxina. O motivo N-terminal é composto por $\beta\alpha\beta$ enquanto o C-terminal apresenta $\beta\beta\alpha$, os dois são conectados por uma α -hélice. O motivo CxxC se localiza antes da primeira α -hélice do N-terminal.

O motivo CxxC geralmente possui a primeira cisteína mais reativa, ou seja encontra-se na forma de tiolato. Portanto essa cisteína N-terminal é a que interage primeiramente com a proteína-alvo oxidada e por isso é denominada a cisteína *attacking*. Essa interação resulta na formação de um dissulfeto intermolecular, que é desfeita pela segunda cisteína do motivo CxxC, chamada de cisteína *resolving* (FIGURA 18- Esquerda) (HOLMGREN, 1995). Conhecendo essas características do motivo CxxC foi desenvolvido o método *trapping mutant* para identificar as proteínas com as quais esse sítio ativo interage (BALMER et al, 2004). Sabendo que a segunda cisteína resolve a ponte de dissulfeto da primeira com a proteína alvo, a mutação dessa segunda impede que essa ponte seja desfeita, mantendo assim a interação da Trx com sua proteína alvo (FIGURA 18-Direita). Em seguida, esses complexos moleculares são isolados e os ligantes podem ser identificados por espectrometria de massas.

O motivo CxxC aparece em várias outras proteínas que podem fazer parte dessa superfamília, por isso ainda existe uma ampla quantidade de proteínas a serem estudadas.

FIGURA 18 . MOTIVO CXXC DAS TIORREDOXINAS E MÉTODO DE TRAPPING MUTANT



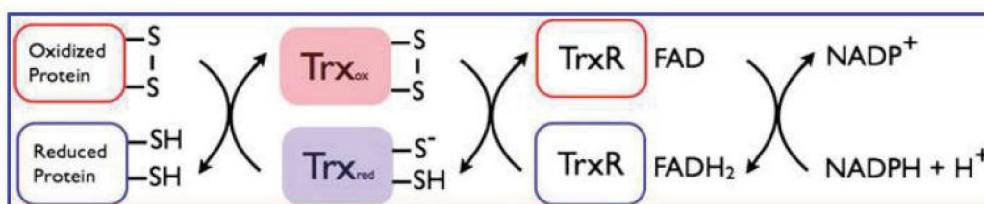
Fonte: Nakao (2015)

LEGENDA: A cisteína N-terminal no motivo CxxC da tiorredoxina é a mais reativa (*attacking*), atacando a proteína-alvo oxidada formando um dissulfeto misto transiente entre as duas proteínas. Essa ligação é desfeita pela cisteína C-terminal (*resolving*), deixando o motivo CxxC oxidado, liberando o alvo reduzido. O método *trapping mutant* consiste na mutação da segunda cisteína para serina, impedindo que interação de Trx e seu alvo seja desfeita.

2.2 TIORREDOXINA 1

A tioredoxina 1 (Trx1) é o principal componente do sistema antioxidante regulando a quantidade de oxidantes nas células para evitar o estresse oxidativo. A Trx1 é uma proteína ubíqua de 12 kDa encontrada no citosol, mas sob estímulos pode ser translocada para o núcleo, onde funciona como um fator transcricional (GASDAKA et al., 1994). No citosol possui a importante atividade de redutase, a qual mantém uma proporção ideal de cisteínas reduzidas no ambiente. Entre seus alvos estão as peroxirredoxinas (Prx) e tioredoxina peroxidase, que são oxidadas formando dissulfeto ao reagir com o peróxido de hidrogênio ou outros alquil hidroperóxidos (NORDBERG e ARNER, 2001). A Trx1 reduz os dissulfetos da proteína alvo, tornando-a ativa novamente (CHAE et al., 1999). Nesse processo, ela fica oxidada e é preciso que a tioredoxina redutase 1 (TrxR1) juntamente com o equivalente redutor NADPH a torne reduzida e ativa novamente (FIGURA 19). Essa atividade de reduzir seus alvos depende do motivo CxxC, característico do sítio catalítico das proteínas da superfamília em que está inserida a Trx1.

FIGURA 19. MECANISMO GERAL DO SISTEMA TIORREDOXINA



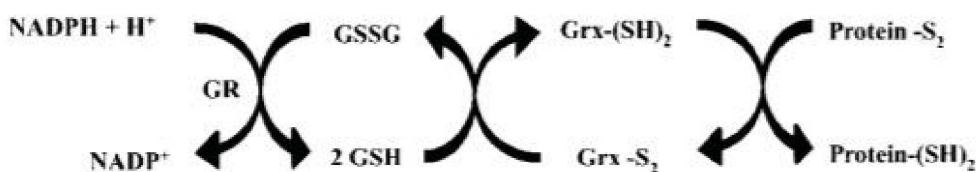
FONTE: Collet (2010).

LEGENDA: Esquema mostrando atividade da tioredoxina (Trx) reduzindo a proteína oxidada, em seguida Trx oxidada é reduzida pela flavoenzima tioredoxina redutase (TrxR), tornando a ativa novamente. Os elétrons provêm do equivalente redutor NADPH.

2.3 GLUTARREDOXINAS

Outra defesa antioxidante da célula é desempenhada pela glutathiona (GSH), também chamado de γ -glutamilcisteinilglicina, um tripeptídeo contendo um resíduo de cisteína. Juntamente com seu par oxidado, a glutathiona dissulfeto (GSSG), formam um balanço redox intracelular. Existem várias enzimas que dependem da GSH. As glutarredoxinas (Grx) são pequenas proteínas ubíquas, termoestáveis e com atividade de glutathiona oxidoreductase (HOLMGREN, 1979). Elas também pertencem à superfamília das tioredoxinas, possuindo o dobramento tioredoxina. A atividade de redutase é similar da tioredoxina, mas a GSH é a responsável para as Grx retornarem ao estado reduzido e ativo (FIGURA 20). Essa atividade de redutase promove a desglutathionização, que consiste na reversão do dissulfeto da glutathiona com a cisteína da proteína. Ou seja, as Grxs catalisam a redução da ponte dissulfeto entre a proteína alvo com o GSH (BUSHWELLER, et al, 1992).

FIGURA 20. MECANISMO GERAL DA ATIVIDADE DAS GLUTARREDOXINAS



FONTE: Fernandes (2004)

LEGENDA: Esquema mostrando atividade das glutarredoxinas. A proteína alvo oxidada é reduzida pela glutarredoxina (Grx), que por sua vez é reduzida pela glutathiona e por fim pelo NADPH.

2.4 C5ORF63 E YDR286C

Um trabalho identificou YDR286C como uma possível proteína tiol oxidoreductase, através de um método comparando a informação genômica de larga escala de leveduras com características das estruturas tridimensionais dos sítios ativos de tioredoxinas, glutarredoxinas e proteínas dissulfeto isomerases (FETROW et al., 2001). Esse dado foi confirmado por outra investigação computacional que selecionou no genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* várias possíveis tiol oxidoreductases de acordo com similaridade da estrutura primária e secundária com sítios ativos de cisteínas conhecidas, juntamente com a acessibilidade, localização e reatividade da cisteína (MARINO e GLADYSHEV, 2009). A YDR286C, que possui o

motivo CxxC, apareceu na lista das proteínas preditas e sua anotação é proteína semelhante a glutarredoxina, por isso ela é considerada uma proteína glutarredoxina-like. A YDR286C, também conhecida como MGP12, está codificado no cromossomo 4, resultando uma proteína de 114 aminoácidos. A sua homóloga em humanos possui o gene codificado no cromossomo 5 *open reading frame* (ORF) 63 (C5orf63) e é traduzida para uma proteína de 115 aminoácidos. Tanto YDR286C quanto C5orf63 não possuem estruturas tridimensionais publicadas, mas ambas possuem similaridades com a proteína identificada como 1WJK de *Mus musculus* do banco de dados do PDB (<https://www.rcsb.org/>). Apesar de alguns indícios de que seja uma proteína redox, não há evidências experimentais na literatura comprovando sua função.

Um ensaio prévio do nosso grupo visou identificar alvos moleculares de C5orf63, justamente pela sua homologia com a predita tiol oxidoreductase YDR286C e presença do motivo CxxC, utilizando o método *trapping mutant*. Interessantemente, esses dados indicaram que a cisteína mais reativa do domínio CxxC da C5orf63 é diferente da cisteína mais reativa da maioria das proteínas da superfamília tioredoxina, o que torna esta proteína mais interessante. Entre os principais candidatos a proteína alvo de C5orf63 em células HEK293T estão proteínas *small nuclear ribonucleoprotein Sm D2* (SMD2), *SRA stem-loop interacting RNA binding protein* (SLIRP) e nucleofosmina (NPM) (Nakao e Gladyshev, dados não publicados). A NPM é uma proteína nucleolar que é glutathionilada na cisteína 275 sob estresse nucleolar, levando à translocação e consequente ativação da proteína p53 (YANG et al, 2016). Além disso, pouca informação foi encontrada na literatura sobre C5orf63, apenas um estudo de microarranjo em meningiomas de carácter mais agressivo, que possuem menor expressão de *deleted in colorectal cancer* (DCC), detectou o aumento da expressão de C5orf63 (SCHULTEN et al., 2016). Portanto, tendo em vista a possibilidade de C5orf63 e YDR286C serem proteínas redox, o presente estudo pretendeu caracterizar essa nova tiol proteína, determinando sua localização celular, atividade e identificação de proteínas-alvo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

2-Hidroxietil dissulfeto (HED), 4',6 diamidino-2-fenil indol (DAPI), tiogalactósido de isopropilo (IPTG), acetato de lítio, butil hidroxitolueno (BHT), ditioneitol (DTT), polietilenoglicol 3350 (PEG 3350), dimetilsulfóxido (DMSO), L-glutathione reduzida (GSH), fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), HEPES peróxido de hidrogênio, sulfato ferroso, tris base, DTPA, azida, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), coquetel de inibidor de proteases, *xilenol orange* e β mercaptoetanol (β ME) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich. Bradford foi adquirido da Biorad. Enzimas de restrição EcoRI, NcoI, Sall, XhoI, HindIII, KpnI, MitoTracker CMXRos e Y-PER Yeast Extraction Reagent foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific. Vetor pET28a foi adquirido da Novagen. Vetores p426gpd e pMY25 foram adquiridos da Addgene. Base nitrogenada de levedura com sulfato de amônio da BD Difco e CSM-URA e ágar Y foram adquiridos da MP Biomedicals. KCl e KH_2PO_4 foram adquiridos da Merck. Glicerol foi adquirido da Biotec. NaCl foi adquirido da Hexapur. Na_2HPO_4 foi adquirido da Vetec.

3.2 ANÁLISE COMPUTACIONAL DE C5ORF63 E YDR286C

As sequência de YDR286C (AY557722.1), glutarredoxina-like C5orf63 (NM_001164478.1), glutarredoxina 1 (AAC35798.1), glutarredoxina 2 (AAF37320.2), glutarredoxina 4 (WP_069914806.1) e glutarredoxina 5 (AAH23528.2) foram alinhadas no Clustal Omega. As sequências de C5orf63 e YDR286C foram analisadas no *TargetP-2.0 Server* para identificação de localização subcelular e no banco de dados *PhylomedDB* para analisar conservação filogenética.

3.3 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA C5ORF63 RECOMBINANTE

O gene da C5orf63 (*Homo sapiens*) foi subclonado do plasmídeo pEGFP-C5orf63 (NAKAO, não publicado) para o vetor pET28a, entre os sítios NcoI e XhoI. A etiqueta de hexahistidina foi adicionada na sequência do *primer forward* usado para subclonagem, enquanto o códon de parada foi adicionado no *primer reverso* (Tabela

3), levando a produção da proteína com 123 aminoácidos. Após a subclonagem foi realizada a confirmação por sequenciamento.

TABELA 3. PRIMERS PARA CLONAGEM DE C5orf63 NO VETOR pET28a

Primer	Sequência
C5orf63 NcoI F	5'CTGCCATGGGTCATCATCATCAT CATCATCTGCCTGTGTTG 3'
C5orf63 XhoI R	5'GAACCTCGAGTCAGCCTCCAGT ACTTTGCTG3'

FONTE: A autora (2019).

Bactérias quimiocompetentes BL21 (DE3) foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos. Os pré-inóculos foram feitos inoculando uma colônia em 10 mL de meio LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 1% NaCl). No dia seguinte o inóculo foi feito com a diluição de 1:100 e cultivado até a $DO_{600} = 0,4$ a $0,6$. A indução da expressão da proteína foi realizada com $0,4$ mM de IPTG por 16 horas a 16°C , para melhorar a solubilidade. A purificação foi realizada em tampão nativo segundo descrito (NAKAO et al, 2015). A concentração proteica foi determinada pelo reagente de Bradford.

3.4 DICROÍSMO CIRCULAR

A proteína recombinante também foi analisada por dicróismo circular (DC) em um espectropolarímetro JASCO J-815 com controlador de temperatura asco Peltier-type. Os espectros da composição da estrutura secundária, alfa-hélices (222 nm) e folhas betas (215 nm), foram obtidos de $400\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução proteica $0,13\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em uma cubeta de quartzo em 25°C e 37°C . A desnaturação foi medida em 222 nm, entre 37°C e 99°C .

3.5 ATIVIDADE DE GLUTARREDOXINA - ENSAIO HED (2-HIDROXIETIL DISSULFETO)

Para testar a atividade de desglutathionilação foi feito o ensaio que testa a redução do 2-hidroxietil dissulfeto (HED). Como controle positivo foi usado 25 nM de Grx2 humana. A mistura reacional continha 0,1 M Tris (pH 7,4), 2 mM EDTA, 0,1 mg/mL BSA, 1 mM GSH, 6 µg/mL glutarredoxina redutase, 0,7 mM HED, 0,2 mM NADPH. A reação foi preparada na cubeta de 1 mL, sem NADPH e Grx2, um agitador magnético foi colocado para homogeneizar a reação por 3 minutos a 30°C. A oxidação do NADPH foi monitorada no espectrofotômetro a 340 nm. Essa reação foi usada para zerar a absorbância, e logo depois foi adicionado o NADPH que foi misturado por um minuto e foi feita uma leitura para essa reação (controle negativo, sem enzima). Em seguida, foi adicionada a enzima Grx2 (controle positivo). A leitura da absorbância foi feita por 4 minutos. O próximo passo foi preparar a reação substituindo a Grx2 pela C5orf63 (50 nM e 500 nM).

3.6 ATIVIDADE PEROXIDÁSICA- ENSAIO FOX

O ensaio FOX (*Ferrous Oxidation-Xylenol Orange*), para detectar atividade de peroxidase, foi realizado de acordo com Jiang (1992). A mistura reacional continha 0,05 M HEPES, 0,1 mM DTPA, 1 mM azida, 300 µM de peróxido de hidrogênio e 0,5 mM DTT. Foi realizada uma incubação de 3 µM de C5orf63 por 30 minutos a 37°C. O controle negativo era composto pelo solvente da proteína recombinante (PBS com 10 % glicerol). Em seguida, a reação foi incubada por 30 minutos com xilenol laranja (7,6 mg em 90 mL de metanol com 79,8 mg de BHT) e 25 mM sulfato ferroso (196 mg em 20 mL de H₂SO₄). A absorbância foi determinada em 550 nm. Para determinar a concentração de peróxido foi feita uma curva-padrão de peróxido de hidrogênio.

3.7 LOCALIZAÇÃO CELULAR EM HEK293T

As células HEK293T (5x10⁴), plaqueadas em lamínulas de 13 mm de diâmetro, foram transfectadas com pEGPF-C5orf63 (Nakao, não publicado) com protocolo de precipitação de cálcio. Após 48 horas de expressão, as células foram

incubadas com 200 nM MitoTracker CMXRos por 15 minutos a 37°C para marcação mitocondrial. A fixação foi feita com formaldeído 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a montagem nas lâminas, com PBS glicerol 50% e DAPI, as imagens foram capturadas com o microscópio multifoton confocal A1 MP+ (Nikon) no CTAF-UFPR.

3.8 CLONAGEM DE YDR286C

O gene de YDR286C foi clonado a partir do plasmídeo 2NP-F8 do banco de plasmídeos do Dr. Vadim Gladyshev, para o plasmídeo de expressão em leveduras p426gpd, com adição do sítio de clivagem da protease TEV (Tobacco Etch Virus) e da etiqueta de HA no C-terminal. As mutações das cisteínas para serina na posição 31 (SC) e 34 (CS) foram inseridas nos *primers forward* de clonagem (Tabela 4). Em paralelo, também foi feita a clonagem do gene de YDR286C no vetor pYM25 entre os sítios HindIII e KpnI, para obter a proteína fusionada com a proteína fluorescente GFP no C-terminal. O vetor pET-T7-MBP-YDR286C-opt, com otimização de códons de YDR286C e fusão com a proteína *maltose binding protein* (MBP), contendo um sítio da protease TEV entre o MBP e a YDR286C, foi fornecido gentilmente pelo pesquisador Bruno Manta do *New England Biolabs*.

TABELA 4. PRIMERS PARA CLONAGEM DE YDR286C-TEV-HA NO VETOR p426gpd

Primer	Sequência
Primer YDR286C EcoRI F	5'CTGGAATTCATGTTGAGAGCGTT CCGCTGTTCTATACATACTTCGAG GGTATTGTTACATGATGCTGGAGT GAAATTAACTTTCTTCTCAAAGCCT AATTGTGGGTTATGC3'
Primer YDR286C-TEV-HA Sall R	5'GCCGTCGACTCAAGCGTAATCT GGAACATCGTATGGGTAGCCCTG AAAATAAAGATTCTCTCTAGATTGC ATTCTCCTTATTTTATCACTGATAT

	CGTCT3'
YDR286C CS F1	5'CGTTCGCTGTTCTATACATACT TCGAGGGTATTGTTACATGATGCT GGAGTGAAATTAAC TTTCTTCTCAA AGCCTAATTGTGGGTTA <u>AGCG</u> GATC AAGC3'
YDR286C SC F	5'GTTGAGAGCGTTCGCTGTTCTA TACATACTTCGAGGGTATTGTTAC ATGATGCTGGAGTGAAATTAAC T T TCTTCTCAAAGCCTAAT <u>AGT</u> GGGT TATGC3'
YDR286C yeGFP HindIII F	5'CGATAAGCTTATGTTGAGAGCGT TCCGCTGTTCTATACAT3'
YDR286C yeGFP KpnI R	5'CGTAGGTACCTTATTTGTACAAT TCATCCATACCATGGGT3'

FONTE: A autora (2019).

3.9 ESTUDO DO FENÓTIPO Δ YDR286C

3.9.1 Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas foram a BY4741 (MAT α ; His 3 Δ 1; Leu2 Δ 0; Met 15 Δ 0; Ura3 Δ 0) selvagem (WT) e a *knockout* de YDR286C (Δ YDR286C). As leveduras foram cultivadas em meio *yeast peptone dextrose* (YPD) (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L de glicose e 20 g/L ágar) a 30°C por 2 dias.

3.9.2 Transformação de leveduras

Para a transformação as leveduras cultivadas em placa com YPD foram coletadas e incubadas em 500 μ L de acetato de lítio 0,1 M. Após homogeneizar por vórtex por 1 minuto, as células foram centrifugadas por *mini spin*. O sobrenadante foi descartado e o tamanho dos *pellets* foi ajustado para o equivalente a

aproximadamente 50 μ L. Em seguida, foram adicionados 240 μ L de 50% PEG 3350 e 36 μ L de acetato de lítio 1 M. A solução foi misturada com as leveduras por pipetagem. Posteriormente, foi adicionado 10 μ L de *carrier single strand sperm salmon DNA*, juntamente com 1 μ g de plasmídeo. Após misturar por vortex, 50 μ L de água estéril foi adicionada e homogeneizado novamente. As leveduras foram incubadas em 30°C por 40 minutos sob agitação. Após esse período foram adicionados 40 μ L de DMSO e novamente incubadas a 42°C por 40 minutos em banho úmido. As células foram deixadas no gelo por 10 minutos antes de 200 μ L da suspensão ser plaqueada nas placas de meio seletivo sem uracila (7 g/L base nitrogenada de levedura com sulfato de amônio, 0,7 g/L CSM-URA, 10% glicose e 20 g/L ágar), as quais foram incubadas a 30°C por três dias. As placas foram fechadas com parafilme para impedir o ressecamento do meio durante o período de incubação.

3.9.3 Ensaio de viabilidade de leveduras

Leveduras BY4741 selvagem e Δ YDR286C transformadas com o vetor vazio e para superexpressão de YDR286C foram cultivadas em placas ágar de meio seletivo. Uma colônia foi selecionada e pré-inoculada em 3 mL de meio seletivo líquido (-URA) *overnight* a 30°C no *shaker* a 225 rpm. No dia seguinte as leveduras foram diluídas para $DO_{600} = 0,1$ em 175 μ L em placas de 96 poços estéril. As condições testadas foram: apenas meio seletivo, com adição de tratamento de 20 mM peróxido de hidrogênio, 0,75 mM diamida, 5 μ g/mL antimicina ou 10 μ g/mL rotenona. Os tratamentos foram adicionados no meio de crescimento no início do experimento, com exceção do peróxido de hidrogênio que foi pré-incubado com as leveduras, para evitar a sua degradação, por 30 minutos a 30°C sob agitação. Adicionalmente foi testado o crescimento aeróbico com a glicose do meio seletivo substituída por 3% de glicerol. A curva de crescimento das leveduras foi medida pela DO_{600} a cada 15 minutos por 48 horas ou 72 horas com agitação a 30°C.

3.9.4 Ensaio de longevidade

As leveduras selvagem e Δ YDR286C congeladas (estoque em -80°C com 15 % de glicerol) foram semeadas em placas de YPD incubadas por 30°C por dois

dias. Para o pré-inóculo quatro a cinco colônias foram inoculadas *overnight* em 3 mL de meio sintético completo de glicose (0,18% base nitrogenada de leveduras sem aminoácidos e sem sulfato de amônio, 0,5% sulfato de amônio, 0,14% NaH_2PO_4 , 0,173% de mistura de aminoácidos, 2% glicose, pH 6,0 ajustado com NaOH). Em seguida, foi feita a diluição da cultura para $\text{DO}_{600} = 0,1$ em 50 mL de meio sintético completo (3 replicatas para selvagem e 3 para $\Delta\text{YDR286C}$) e a incubação foi feita a 30°C sob agitação de 225 rpm no *shaker*. A cada 2 a 3 dias foi feito o monitoramento da sobrevivência fazendo o teste do *spot*, plaqueando 5 μL de cada uma das diluições seriadas de 10 vezes em placas de YPD. Essas placas foram incubadas a 30°C por dois dias e fotografias foram capturadas. O tempo total do experimento foi de 46 dias.

3.10 EXPRESSÃO DE YDR286C-TEV-HA EM LEVEDURAS

Leveduras transformadas com o vetor vazio (p426gpd), p426gpd YDR286C-TEV-HA selvagem, CxxS e SxxC foram pré-inoculadas em 5 mL de meio seletivo a 30°C *overnight* sob agitação 225 rpm. No dia seguinte, foi feito o inóculo com a diluição 1:12,5 em 25 mL de meio seletivo nas mesmas condições. No próximo dia, as células foram coletadas centrifugando a 3000 *g* por 5 minutos a 4°C. A lise foi realizada com 625 μL de *Y-PER Yeast Extraction Reagent* com inibidor de protease com agitação a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a centrifugação a 14000 *g* 10 minutos, o sobrenadante (solúvel) e o *pellet* (insolúvel) foram analisados por *Western Blot*.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram mostrados como média (\pm) e desvio padrão (SD). Para comparação dos valores entre grupos, foi utilizado one-way ANOVA com pós-teste Tukey ou two-way ANOVA (Graphpad Software, Prism6). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de P foi menor que 0.05.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS ESTRUTURAS PRIMÁRIAS DA C5ORF63 E YDR286C

O alinhamento das sequências de aminoácidos, obtidas no banco de dados NCBI, de YDR286C de *S. cerevisiae* e C5orf63 de *Homo sapiens* com as glutarredoxinas 1, 2, 4, 5 de *Homo sapiens* confirmou que essas possuem em comum o motivo CxxC. Este motivo está presente na superfamília das tioredoxinas, caracterizando um domínio com função usualmente catalítica redox, sendo capaz de ser oxidado ou reduzido. Além disso, alguns resíduos posicionados na região C-terminal possuem semelhança com as glutarredoxinas (FIGURA 21) (DISCOLA et al., 2009).

FIGURA 21. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE YDR286C DE *Saccharomyces cerevisiae* E GLUTARREDOXINA-LIKE (C5ORF63) DE *Homo sapiens*, COM GLUTARREDOXINA 1, 2, 4 E 5 DE *Homo sapiens*

YDR286C	-----MLR--AF-----RCSIHTSR
GLUTAREDOXIN-LIKE	-----MLWFQGNMQIARSSFGLF--LR-----NCSAS---
GLUTAREDOXIN5	MS---GSL--GRAAAALRWGRGAGGGGLNGPGVRA-----AGSGAGGGGSAAEQ
GLUTAREDOXIN4	-----MSTTIEK
GLUTAREDOXIN	-----MQQEF
GLUTAREDOXIN2	MNPRDKQVSRFSPDKDVYTWVALAGIQRSGSPGRTRSAARRMESNTSSSLENLATAPVNG
YDR286C	VLLHDAGVKLTFFSK----PNCGLCDQAKEVIDDVFERKEFHNAVSLEIVNITDRNA
GLUTAREDOXIN-LIKE	---KTLPLVLTLETK----DPCPLCDEAKEVLPYENR-----FILQEVNITLPENS
GLUTAREDOXIN5	LDALVKKDKVVFELKGTPEQPQCSFSNAVVQILRLHGV---RD---YAAYNVLD-DPE
GLUTAREDOXIN4	IQRQIAENPILLVMKSPKLPSCGFSQAQAVQALACGE---R---PAYVDILQ-NPD
GLUTAREDOXIN	VNCKIQPKGVVVFIR----FTCPYCRRAQEILSQLPKQGLLE---FVDITATNHTNE
GLUTAREDOXIN2	IQETISDNQCVVIFSK----TSCSYCTMAKKLFHDMVNYKVVE-----LDLLEYGNQ
	: : * * : : :
YDR286C	KWW--KEY--CFDIPVLHIEKVGDPKSCIKLHFEEDDISDKIRRMQSR-----
GLUTAREDOXIN-LIKE	VWY--ERY--KFDIPVFLNQLFL-----MMHRVNTSKLEKQLLKLEQQSTGG-----
GLUTAREDOXIN5	LRQGIKDYSNWPITIPQVYLNGEVLVG--GCDIILQMHQNGDLVEELKLGIRHSTILLDEKDKQ
GLUTAREDOXIN4	IRAELEKYANWPTTPQLWVDGEVLVG--GCDIVINENYQRGELQQLIKETAARYKSEE--PDA
GLUTAREDOXIN	IQDYLQQLTGARTVPRVFIGKDCIG--GCSDLVSLQSGELITRLKQIGALQ
GLUTAREDOXIN2	FQDALYKMTGERTVPRIFVNGTFIG--GATDTHRLHKEGKLLPLVHQCYLKKSKRKEFQ--
	* * : : : : :
YDR286C	---
GLUTAREDOXIN-LIKE	---
GLUTAREDOXIN5	DSK
GLUTAREDOXIN4	E--
GLUTAREDOXIN	---
GLUTAREDOXIN2	---

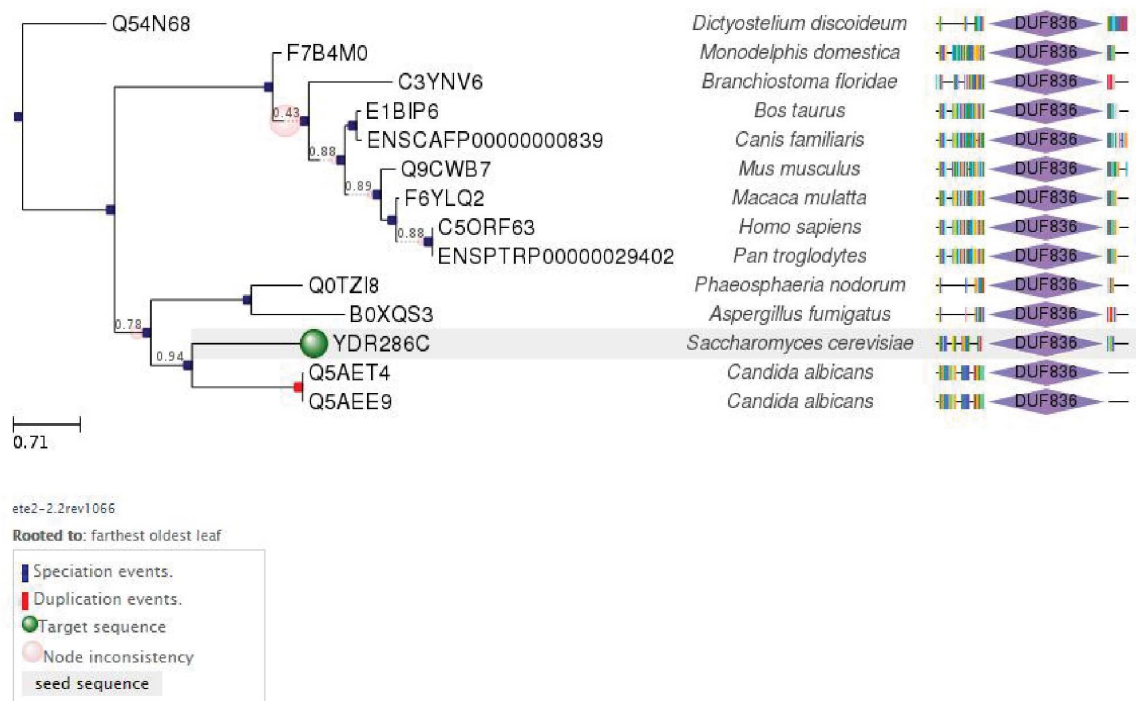
FONTE: A autora (2019)

LEGENDA: Alinhamento das sequências de YDR286C de *Saccharomyces cerevisiae* e glutarredoxina-like (C5orf63) de *Homo sapiens*, com glutarredoxina 1, 2, 4 e 5 de *Homo sapiens*. Em amarelo está destacado o motivo CxxC, em verde e vermelho resíduos que são conservados nas estruturas das glutarredoxinas.

A análise filogenética comparando a proteína de levedura com a humana mostrou que ambas possuem o domínio de função desconhecida 836 (DUF836) e que são homólogas ortólogas (FIGURA 22). O fato de não terem sofrido paralogia é

indício de que esta é uma proteína de função conservada, apesar de sua atividade ainda não ter sido descrita.

FIGURA 22. ANÁLISE DA FILOGENIA DO GENE YDR286C E C5ORF63 NO BANCO DE DADOS



FONTE: <http://phylomedb.org/>.

LEGENDA: Análise filogenética de C5orf63 e YDR286C no banco de dados PhylomeDB. A árvore filogenética mostra que não houve nenhum evento de duplicação entre YDR286C e C5orf63, indicando que são homólogas ortólogas. O único evento de duplicação ocorreu na *Candida albicans*.

Há indícios de que essa possível proteína redox seja mitocondrial, por isso a sequência foi analisada para determinar sua localização celular, através do programa *TargetP-2.0 Server*. A predição obtida foi de um peptídeo-sinal para mitocôndria (FIGURA 23).

FIGURA 23. PREDIÇÃO DE LOCALIZAÇÃO CELULAR

C5orf63 Prediction: Mitochondrial transfer peptide CS pos: 23-24, RNC-SA, Pr: 0.2892				
Protein type	Other	Signal peptide	Mitochondrial transfer peptide	
Likelihood	0.1377	0.0179	0.8444	

YDR286C Prediction: Mitochondrial transfer peptide CS pos: 32-33, NCG-LC, Pr: 0.1448				
Protein type	Other	Signal peptide	Mitochondrial transfer peptide	
Likelihood	0.1248	0.0004	0.8748	

Fonte: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-2.0/index.php>

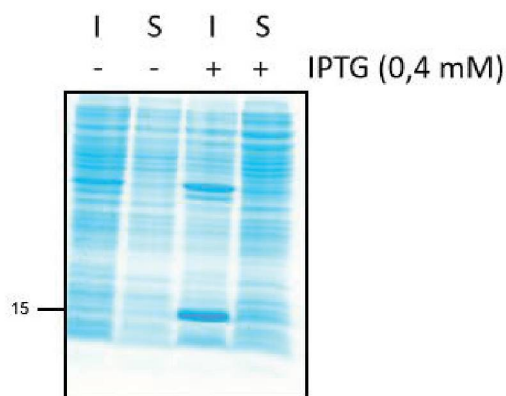
LEGENDA: Identificação de localização subcelular através da sequência de aminoácidos de C5orf63 e YDR286C. Ambas preditas com peptídeo-sinal para mitocôndria. Valor mais próximo de 1 indica maior a probabilidade de possuir um peptídeo sinal para mitocôndria.

Em resumo, a análise das estruturas das proteínas humana e levedura permite concluir que ambas possuem o motivo potencialmente redox CxxC, e características das glutarredoxinas. Além disso, a análise filogenética indica que são proteínas evolutivamente conservadas. Outra informação importante é que essas duas proteínas possuem em sua sequência o peptídeo-sinal mitocondrial.

4.2 ATIVIDADE REDOX DA PROTEÍNA RECOMBINANTE C5ORF63

Para testar se a proteína purificada possui atividade enzimática, primeiramente ela foi expressa e purificada. O construto usado codifica uma proteína de fusão 6 His-C5orf63, cuja massa molecular é de 14,4 kDa. A purificação da proteína recombinante mostrou-se um desafio pela insolubilidade da mesma. Quando foi testada a expressão da proteína humana C5orf63 em bactérias, não foi possível obter a proteína na fração solúvel, o que tornou a purificação inviável (FIGURA 24). Para evitar a perda da possível atividade e estrutura, o que pode interferir nas suas interações com os alvos, não foram testadas condições desnaturantes na purificação. Portanto, a solução foi realizar a expressão mais lenta e em temperatura mais baixa. Após a indução a 16°C por 16 horas, a purificação foi realizada segundo descrito (NAKAO et al., 2015). No processo de purificação, houve perda da proteína de interesse, observada pela sua presença nas lavagens, mas mesmo assim foi possível purificar a C5orf63 (FIGURA 25).

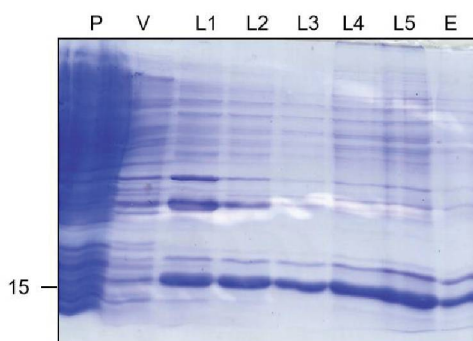
FIGURA 24. TESTE DE SOLUBILIDADE DE C5orf63



Fonte: A autora (2019)

LEGENDA: Bactérias BL21 (DE3) foram transformadas com plasmídeo pET28a-C5orf63 e a expressão foi induzida com 0,4 mM de IPTG por 3 horas a 37°C. Em seguida, a lise foi realizada com tampão de lise nativo mais sonicação. As partes insolúvel (I) e solúvel (S) foram analisadas por SDS-PAGE e coloração de Coomassie Blue.

FIGURA 25. GEL DA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C5orf63

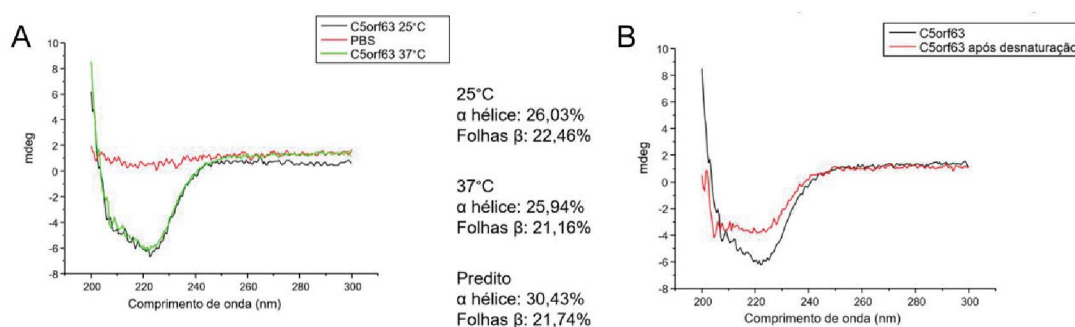


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Gel de cada etapa da purificação da proteína recombinante C5orf63 em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue. P- pellet, V-void, L1- lavagem 1, L2- lavagem 2, L3- lavagem 3, L4- lavagem 4, L5- lavagem 5, E- eluato.

Para avaliar a estrutura secundária da proteína purificada, foi realizada uma análise de dicroísmo circular. Constatou-se que a quantidade de α -hélices e folhas β é próxima dos obtidos na predição pelo programa online PsiPred. A quantidade de α -hélices predita era de 30,43%, o espectro de DC mostrou 26,03% a 25°C e 25,94% a 37°C. Já a quantidade de folhas β preditas era de 21,74%, e a 25°C havia 22,48% dessa estrutura secundária e a 37°C, 21,16% (FIGURA 26A). O espectro de DC foi também avaliado após a incubação na temperatura de 37°C a 99°C. Interessantemente, a proteína ainda manteve sua estrutura secundária (FIGURA 26B). Esse dado indica a possibilidade de que C5orf63 seja uma proteína termoestável.

FIGURA 26. ANÁLISE POR DICROÍSMO CIRCULAR DE C5orf63



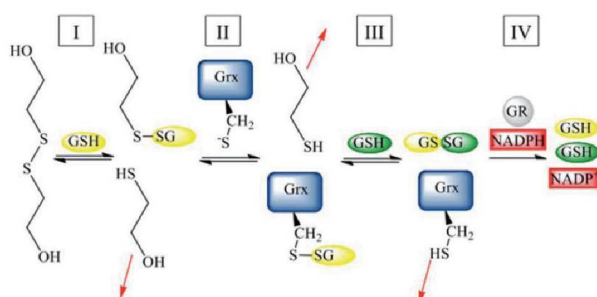
FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: A estrutura secundária de C5orf63 foi analisada por dicroísmo circular. A quantidade de α hélice e folhas β foi analisada 25°C e 37°C (A). A estrutura secundária foi analisada antes e após a desnaturação de 37°C a 99°C (B).

Com a proteína C5orf63 purificada, foram testadas suas possíveis reações enzimáticas. Para avaliar a atividade glutarredoxina, foi feito o ensaio de HED. O HED é substrato clássico para se determinar a atividade Grx, pois possui um dissulfeto, o qual pode ser reduzido por GSH, produzindo GSSG, em uma reação catalisada por Grx. A velocidade da reação pode ser monitorada pela reação de redução de GSSG pela NADPH, catalisada glutathiona redutase (GR) (FIGURA 27). A oxidação da NADPH pode ser monitorada em 340nm.

Por isso, como controle positivo da reação foi utilizada a Grx2 recombinante humana. A atividade de C5orf63 foi testada substituindo a Grx2. Enquanto o controle Grx2 apresentou a atividade de 77,1 $\mu\text{M}/\text{min}$, as duas concentrações de C5orf63, 50 nM e 500 nM, não apresentaram diferenças em relação ao controle negativo sem enzima (FIGURA 28), sugerindo que esta proteína não apresenta atividade glutarredoxina.

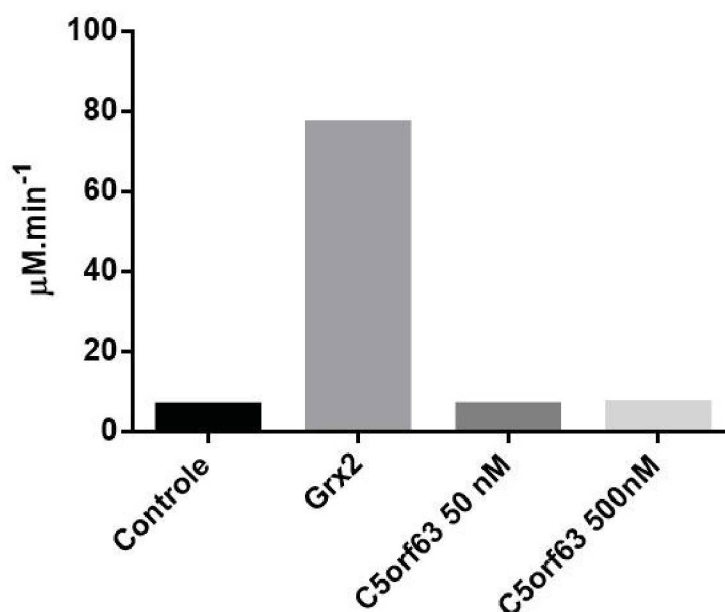
FIGURA 27. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO ENSAIO HED



FONTE: Netto (2016)

LEGENDA: HED reage com GSH produzindo um dissulfeto misto entre 2-mercaptoetanol e GSH, liberando um 2-mercaptoetanol (I). A redução do dissulfeto misto entre 2-mercaptoetanol e GSH pela Grx libera 2-mercaptoetanol e Grx glutathionilada (II). Então GSH reduz a Grx glutathionilada (III) resultando em Grx e GSSG, que é reduzido por NADPH na reação catalizada por glutathiona redutase (GR).

FIGURA 28. ENSAIO HED PARA ATIVIDADE DE GLUTARREDOXINA

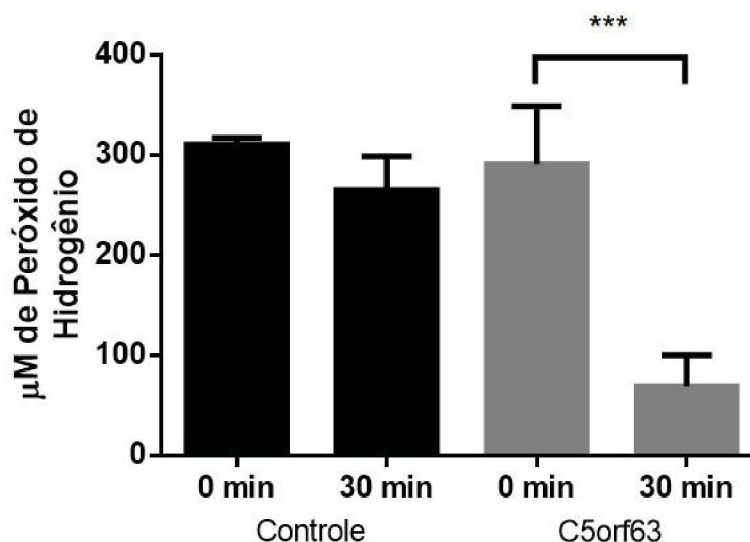


FONTE: A autora (2019)

LEGENDA: Ensaio para testar a atividade de redução de dissulfeto do HED. A reação com 0,1 M Tris pH 7,4, 2 mM EDTA, 0,1 mg/mL BSA, 1 mM GSH, 6 μg/mL glutaredoxina redutase, 0,7 mM HED e 0,2 mM NADPH (controle). A reação foi iniciada com a adição da enzima, 25 nM de Grx2 ou 50 nM e 500 nM de C5orf63. A absorbância a 340 nm foi adquirida por por 4 minutos. n=1

Posteriormente, foi testada a atividade de degradação de peróxido de hidrogênio cujas concentrações na mistura reacional foram determinadas pelo ensaio de FOX. A C5orf63 foi incubada na reação com 300 μM de peróxido de hidrogênio. Foi possível detectar uma redução significativa da quantidade de peróxido após a incubação com 3 μM de C5orf63 por 30 minutos em comparação ao controle negativo sem a enzima (FIGURA 29), sugerindo que a C5orf63 apresente uma atividade peroxidásica.

FIGURA 29. ENSAIO FOX PARA ATIVIDADE DE PEROXIDASE



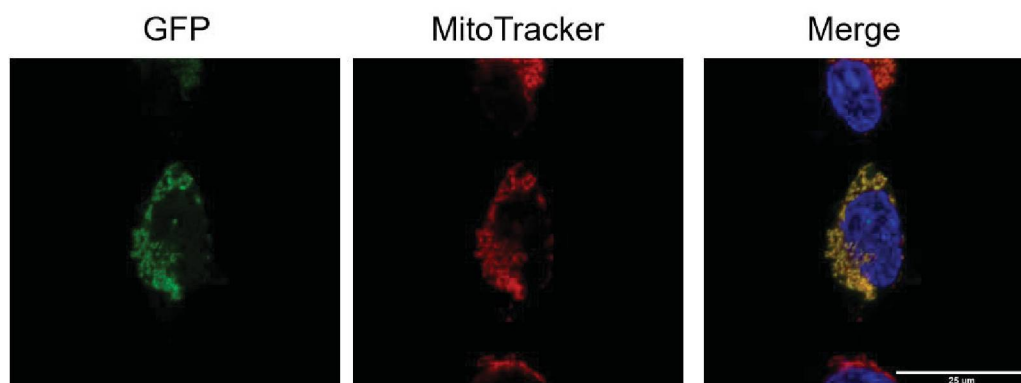
FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Ensaio para determinar a degradação do peróxido com FOX. Foi realizada uma incubação de 30 minutos a 37°C com 3 μM de C5orf63. O controle negativo é composto por solvente da recombinante (PBS com 10 % glicerol). Após esse período foi adicionado FOX e incubado por mais 30 minutos. Absorbância a 550 nm convertida a concentração (μM) pela curva de peróxido. n=3

4.3 LOCALIZAÇÃO CELULAR

Os estudos computacionais predisseram que a C5orf63 seria uma proteína mitocondrial. Para confirmar esse dado, foi feita a transfecção de células HEK293T com C5orf63 clonada no vetor pEGFP-C1, as mitocôndrias foram marcadas com sonda mitocondrial vermelha, MitoTracker CMXRos. A sobreposição das duas fluorescências revela a presença de C5orf63 na mitocôndria (FIGURA 30). A presença de YDR286C na mitocôndria de leveduras foi confirmada através da transformação do construto de YDR286C com GFP (FIGURA 31).

FIGURA 30. LOCALIZAÇÃO DE C5ORF63 EM HEK293T APÓS ESTÍMULO OXIDANTE



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Células HEK293T foram transfectadas com pEGFP-C5orf63. Quarenta e oito horas depois, foi feita a marcação mitocondrial com 200 nM de MitoTracker CMXRos por 15 minutos a 37°C. Após a fixação, as células foram marcadas com DAPI no meio de montagem. Imagem representativa de n=3.

FIGURA 31. LOCALIZAÇÃO MITOCONDRIAL DE YDR286C EM *Saccharomyces cerevisiae*

FONTE: A autora (2019).

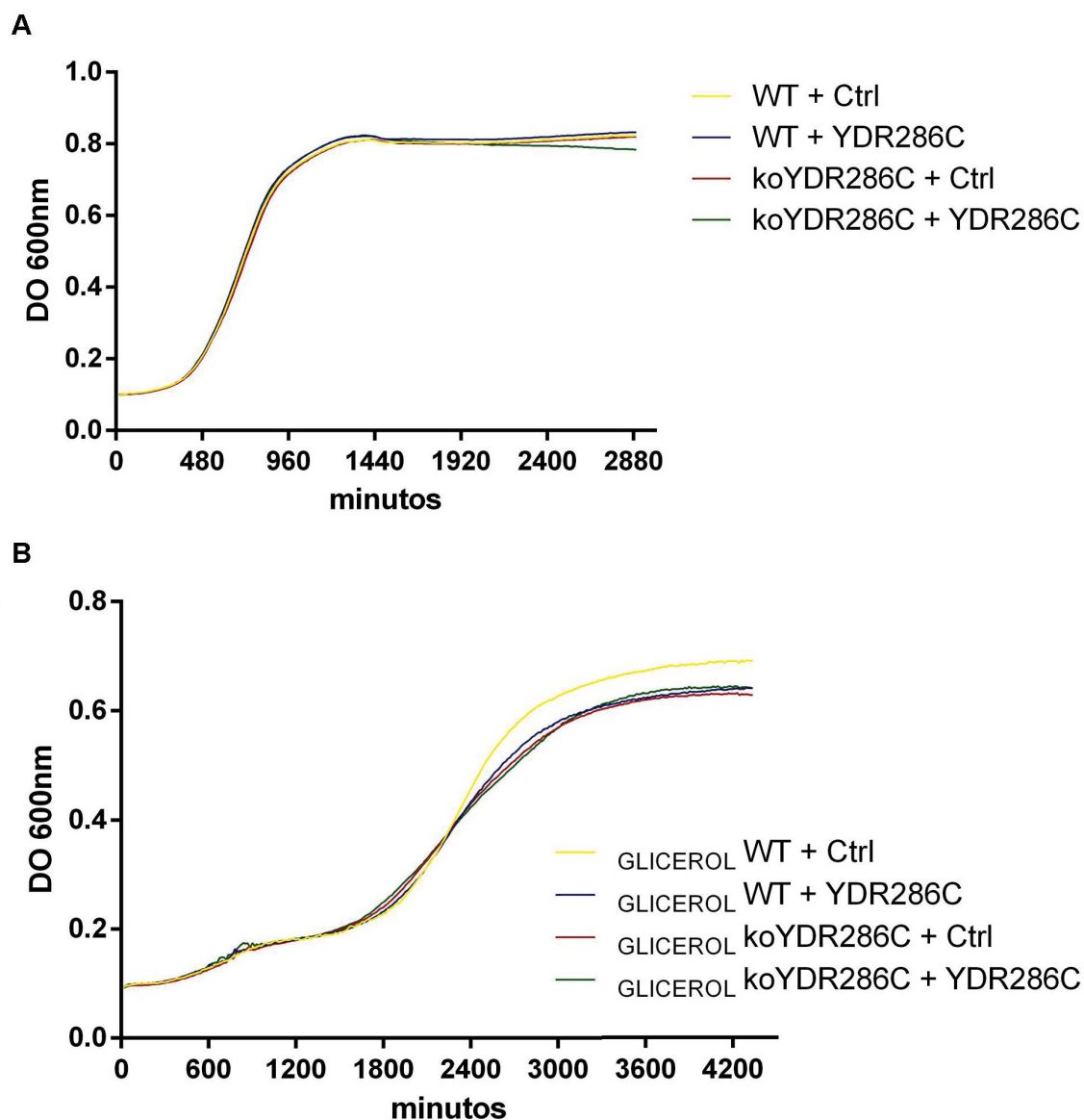
LEGENDA: Leveduras transformadas com YDR286C-GFP, marcação da fluorescências verde com morfologia similar a mitocôndria. Imagem representativa n=3

4.4 FENÓTIPO Δ YDR286C

Para se buscar a função da YDR286C, foi realizada uma curva de crescimento com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) selvagem e *knockout* de YDR286C (Δ YDR286C) transfectadas com vetor vazio e com p426gpd-YDR286C. Após 48 e 72h, não foi observada nenhuma diferença de crescimento entre a linhagem selvagem e a Δ YDR286C, ambas com ou sem a superexpressão de YDR286C (FIGURA 32A). Sabendo que a YDR286C é uma proteína mitocondrial, foi analisada também o

crescimento em condição de respiração mitocondrial, visando evidenciar o efeito da ausência de YDR286C. No meio com glicose as leveduras produzem ATP pelo metabolismo fermentativo, enquanto que alterando essa fonte de carbono para o glicerol, elas crescem através no metabolismo aeróbico, mas esse crescimento é mais lento, por isso o ensaio foi feito por 72 horas. No entanto, não foi observada nenhuma diferença significativa entre a linhagem *knockout* de YDR286C e a selvagem (FIGURA 32B). Como YDR286C pode ser uma proteína redox ativa, foram testados estímulos oxidantes, como peróxido de hidrogênio e diamida. Porém, apesar de ambos os oxidantes terem diminuído a viabilidade das leveduras, não houve diferença entre a linhagem selvagem e a Δ YDR286C dentro do tratamento (FIGURA 33A e 33B). Também foram testados compostos que interferem na atividade mitocondrial, como a antimicina e rotenona, mas esses tratamentos não causaram perda da viabilidade de nenhuma das leveduras (FIGURA 33C e 33D). É possível que a concentração utilizada não tenha sido suficiente para causar um efeito danoso. Assim, os ensaios de viabilidade em leveduras com e sem tratamentos foram incapazes de evidenciar um fenótipo relacionado a YDR286C.

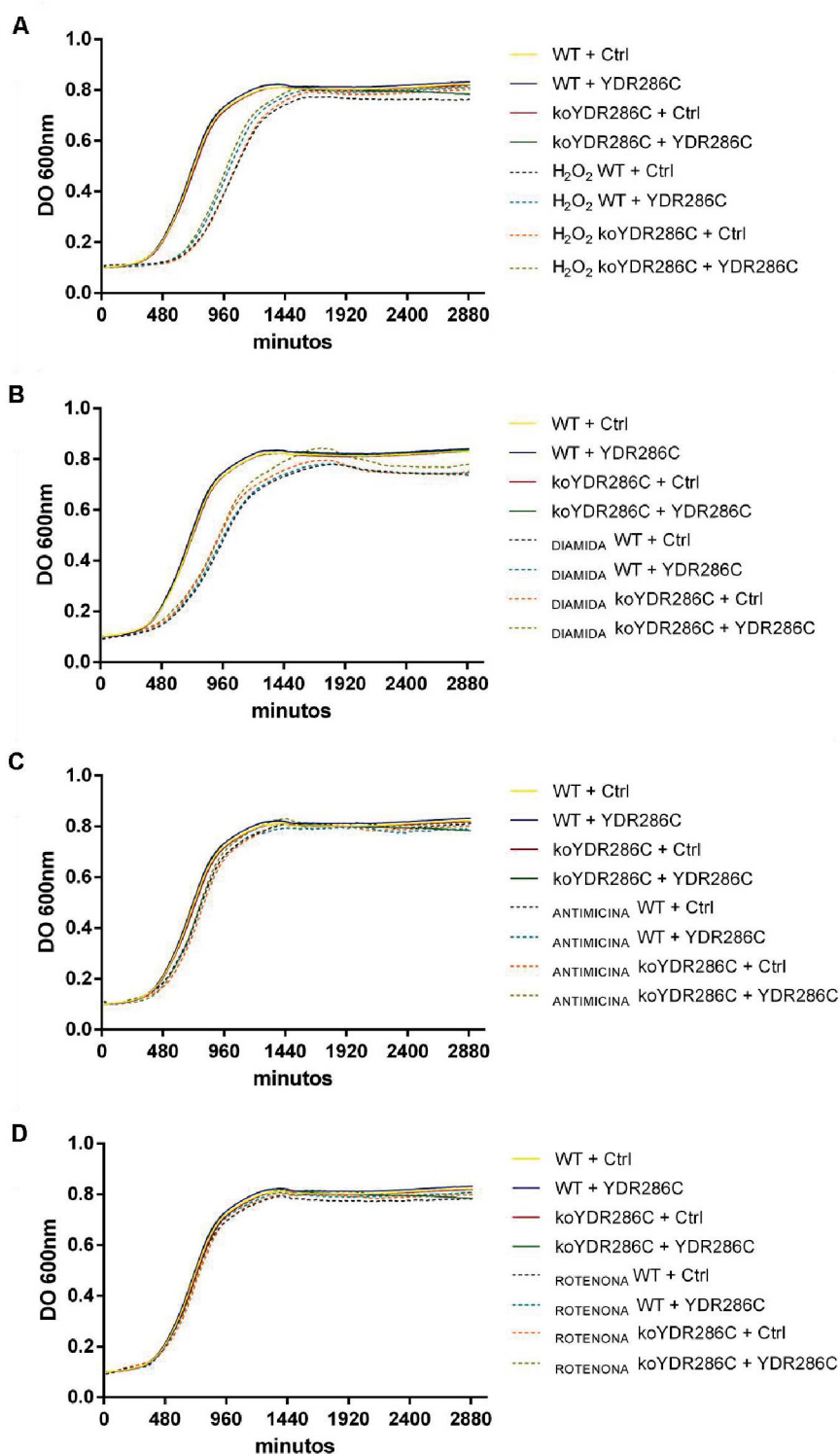
Esses ensaios com leveduras indicam que YDR286C não é uma proteína essencial/vital para a sobrevivência e crescimento das leveduras.

FIGURA 32. ENSAIO DE VIABILIDADE DE EM LEVEDURAS SELVAGEM E Δ YDR286C

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Leveduras selvagem e knockout de YDR286C transformadas com vetor vazio (Ctrl) ou YDR286C foram cultivadas em meio seletivo com glicose (A) e glicerol (B). O crescimento das leveduras a 30°C foi acompanhado através da DO₆₀₀ a cada 15 minutos por 48 horas em A e por 72 horas em B. n=3 com triplicata técnica.

FIGURA 33. ENSAIO DE VIABILIDADE DE EM LEVEDURAS SELVAGEM E Δ YDR286C COM TRATAMENTOS.

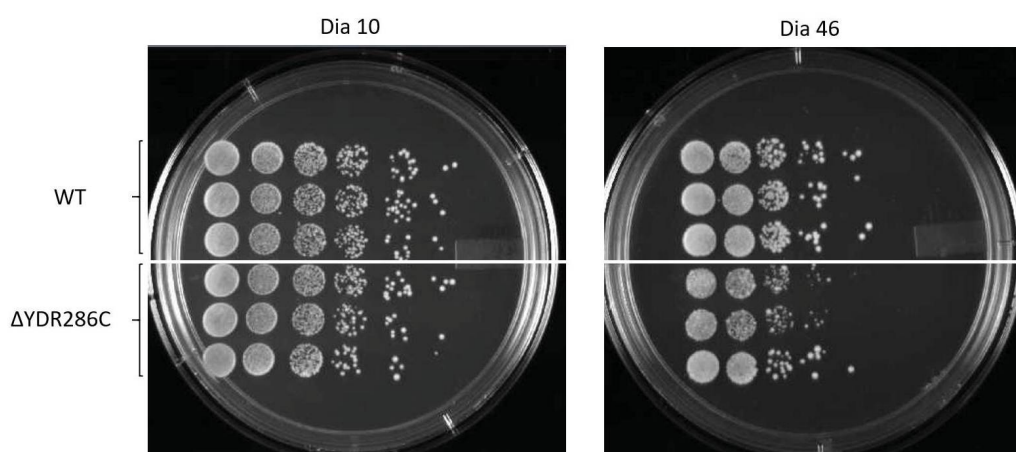


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Leveduras selvagem e knockout de YDR286C transformadas com vetor vazio (Ctrl) ou YDR286C foram cultivadas em meio seletivo. Os tratamentos usados foram 20 mM peróxido de hidrogênio (A), 0,75 mM diamida (B), 5 μ g/mL antimicina (C) ou 10 μ g/mL rotenona (D). O crescimento das leveduras a 30°C foi acompanhado através da DO₆₀₀ a cada 15 minutos por 48 horas. n=3 com triplicata técnica.

As leveduras têm sido empregadas para estudo de longevidade. Por isso, foi comparada a longevidade das leveduras selvagem e $\Delta YDR286C$. Neste ensaio, mede-se o tempo total de vida das leveduras após atingir o crescimento máximo. As leveduras crescem até atingir a fase estacionária consumindo todos os nutrientes do meio, em seguida elas são mantidas em cultivo no mesmo meio. A viabilidade das leveduras é monitorada através das colônias formadas em placas de meio sólido, para avaliar o tempo máximo que as leveduras sobrevivem (PARRELLA e LONGO, 2008). Após 46 dias, as leveduras $\Delta YDR286C$ sobreviveram menos que as selvagens e apresentaram colônias pequenas (*petite*), indício de falha na respiração aeróbica (mitocondrial) (FIGURA 34). Esse fato pode indicar que YDR286C, apesar de não ser vital, é uma proteína importante para manter a função mitocondrial e afeta o tempo de vida da levedura.

FIGURA 34. ENSAIO DE LONGEVIDADE DAS *Saccharomyces cerevisiae*



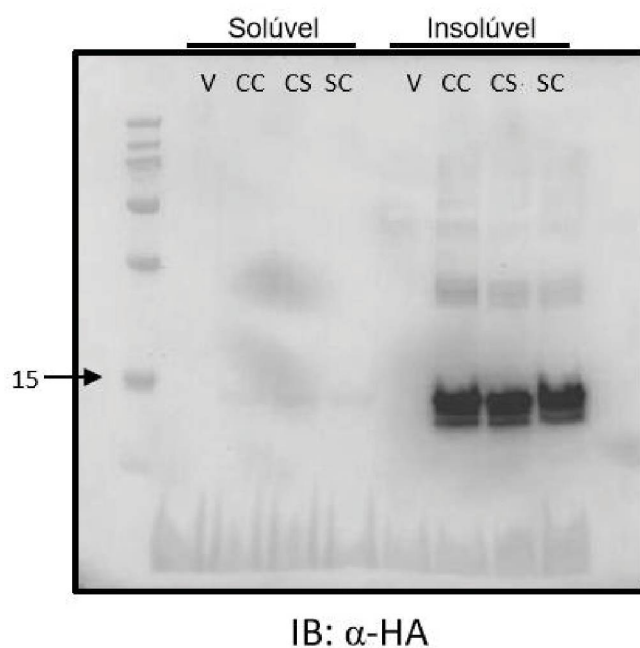
FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 selvagem e $\Delta YDR286C$. Cada spot foi feita com 5 μ L das diluições seriadas de 10 vezes. Comparação entre o dia 10 e 46 do experimento. Triplicada para cada condição (WT e $\Delta YDR286C$). n=1

4.5 BUSCA DE INTERAÇÕES PROTEICAS

Outra maneira de buscar funções de uma proteína é identificando seus alvos. Para isso o modelo de levedura foi utilizado para identificar os alvos da YDR286C. Sabendo-se que a YDR286C possui o motivo CxxC, foi proposta a utilização do método *trapping mutant*. Portanto, os plasmídeos p426gpd YDR286C-TEV-HA selvagem, CxxS e SxxC foram transfectados em leveduras. No entanto, a presença das proteínas superexpressas foi detectada somente na fração insolúvel (*pellet*) (FIGURA 35). Para contornar esse problema, foram testadas diferentes lises, como lise mecânica por *glass beads*, congelamento no nitrogênio líquido, além da adição de detergentes (N-nonyl- β -D-maltoside, NP-40, CHAPS), sendo todas essas condições não desnaturantes, para evitar a perda da conformação nativa e sua consequente interação com proteínas-alvo. Entretanto, após todas essas tentativas não foi possível obter a proteína solúvel. Assim, foram testadas várias alternativas: deleção do peptídeo N-terminal (peptídeo sinal predito), adição da uma etiqueta de solubilidade (S-tag), expressão em bactéria (pET21b) e um teste para expressar C5orf63 em levedura, mas todas falharam na obtenção da proteína solúvel (Anexo 2). O sistema de expressão livre de células também mostrou que YDR286C é uma proteína muito insolúvel (Manta, comunicação pessoal). Por fim, a clonagem com a proteína *maltose binding protein* (MBP) e a otimização de códons permitiu uma boa solubilidade da proteína fusionada expressa e purificada de bactérias (FIGURA 36). Estes construtos serão então utilizados para a expressão das proteínas em bactérias, seguida incubação com extrato mitocondrial de leveduras e *pulldown* com anti-MBP, clivagem proteolítica por TEV e análise das proteínas ligadas com YDR286C selvagem, CxxS e SxxC.

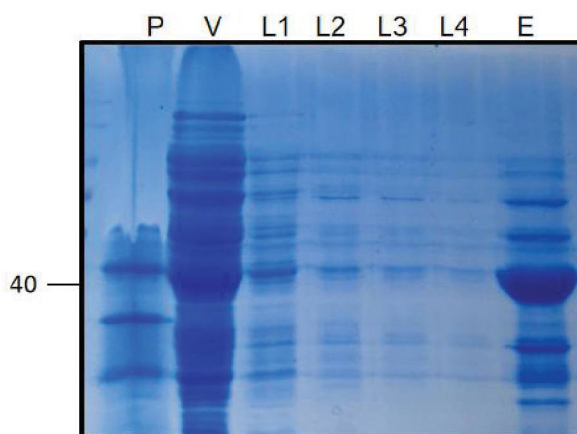
FIGURA 35. EXPRESSÃO DE YDR286C-TEV-HA EM LEVEDURAS



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Leveduras transformadas com vetor vazio (V), p426gpd YDR286C-TEV-HA selvagem (CC), CS e SC, foram lisadas e separadas em parte solúvel e insolúvel. O lisado foi separado eletroforéticamente por SDS-PAGE e analisado por *Western Blot*. A marcação foi realizada com anti-HA.

FIGURA 36. EXPRESSÃO DE YDR286C-TEV-HA EM LEVEDURAS



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Gel de cada etapa da purificação da proteína recombinante MPB-YDR286C em gel SDS-PAGE corado com Coomassie Blue. P- pellet, V-void, L1- lavagem 1, L2- lavagem 2, L3- lavagem 3, L4- lavagem 4, e E- eluato.

5 DISCUSSÃO

Os dados da proteína recombinante C5orf63 indicam que sua estrutura secundária é termoestável, sendo essa uma característica comum também das glutarredoxinas (LEE et al., 2007; YADAV et al., 2013). Entretanto, não foi possível detectar a presença de atividade de redução de dissulfeto das glutarredoxinas, através do ensaio HED. No entanto, não é possível descartar totalmente essa atividade, pois talvez o HED não seja substrato da C5orf63. A possibilidade de ter acontecido degradação ou precipitação proteica levando a perda de atividade da C5orf63 não foi levada em consideração nesse ensaio. Porém foi possível detectar uma possível uma atividade peroxidásica. É possível que C5orf63 seja uma peroxirredoxina (Prx) ou glutathione peroxidase (Gpx). Porém, existe a possibilidade de que os contaminantes provenientes da purificação, já que no gel de purificação aparecem bandas adicionais além da referente a C5orf63. Portanto ensaios mais refinados devem ser realizados para confirmar a função peroxidásica de C5orf63 e também avaliar sua dependência do GSH.

O uso do modelo de levedura é uma boa ferramenta para estudar a função proteica e interações com proteínas. Pelo fato de YDR286C e C5orf63 serem proteínas homólogas ortólogas, ou seja, que não sofreram paralogia, é possível que a função de ambas também seja conservada (KOONIN, 2005). Supondo que a YDR286C também possa ter atividade peroxidásica, foi feito o teste de viabilidade com o tratamento oxidante como peróxido de hidrogênio em leveduras, o qual não revelou uma maior sensibilidade da linhagem *knockout* da YDR286C. Isso não descarta totalmente a possibilidade da YDR286C possuir atividade peroxidásica, porque dentro das células existem outros componentes responsáveis por degradação de peróxidos regulando seus níveis e por consequência, podendo mascarar o fenótipo da ausência da YDR286C sob esse estímulo. Na mitocôndria estão presentes enzimas antioxidantes como a conhecida manganês superóxido dismutase, que além de dismutar o superóxido a peróxido de hidrogênio, também possui atividade de peroxidase quando superexpressa (ANSENBERGER-FRICANO et al., 2013). Além disso, a Gpx1 é uma peroxidase presente tanto no citosol quanto na mitocôndria, com atividade de inativação de peróxido usando o GSH como equivalente redutor (HANDY et al., 2009). Essas são apenas algumas proteínas que mostram que a mitocôndria também é um local equipado com componentes do

sistema antioxidante, o que condiz com o fato de ser a maior fonte de espécies reativas de oxigênio, provenientes da cadeia transportadora de elétrons. Nesse sentido, a presença de outras enzimas com função de peroxidase na mitocôndria poderia explicar o fato da viabilidade das leveduras sem o gene da YDR286C não ter sido afetada nem em condições de estresse oxidativo.

No ensaio de viabilidade também foi testado o oxidante diamida, que induz a formação dissulfetos, levando ao estresse oxidativo em leveduras para tentar evidenciar a possível função redox de YDR286C, mas esse teste também não foi capaz de mostrar o fenótipo de YD286C. Em seguida foram testados disruptores da cadeia transportadora de elétrons, como a antimicina e rotenona, visando intervir no complexo III e I respectivamente, No entanto, estas drogas não foram capazes de gerar nenhum efeito danoso para qualquer uma as leveduras testadas. Uma possibilidade é que a concentração usada não foi adequada para produzir o efeito esperado. Esse tratamento foi feito visando aumentar a disfunção mitocondrial e evidenciar o efeito da ausência de YDR286C nessa organela. Mas o crescimento das leveduras em glicerol, forçando a respiração mitocondrial também falhou em evidenciar qualquer diferença de crescimento entre as leveduras com e sem YDR286C.

O ensaio de viabilidade em leveduras avaliou o crescimento das leveduras selvagens e Δ YDR286C, ambas transformadas com vetor vazio e com YDR286C. Essa superexpressão seria importante, caso a Δ YDR286C exibisse alguma diferença de viabilidade em comparação com a selvagem nas condições testadas. A expressão de YDR286C exógena permitiria avaliar se as leveduras Δ YDR286C recuperam o crescimento normal. Da mesma forma, a superexpressão de YDR286C nas selvagens avaliaria um possível efeito mais evidente pela maior quantidade expressa. Porém, como não foi houve diferenças no crescimento das leveduras em condições testadas não foi possível avaliar esta interpretação.

O ensaio de longevidade de leveduras possibilita o estudo da disfunção mitocondrial, pois no processo de envelhecimento das leveduras ocorre o aumento de mutações no DNA mitocondrial (PARRELLA e LONGO, 2008). A menor quantidade de colônias de Δ YDR286C em comparação com a linhagem selvagem após 46 dias sugere que a YDR286C interfere sutilmente na sobrevivência das leveduras. Esse efeito pode estar relacionado a presença de colônias *petite* nas leveduras Δ YDR286C, um indicador de defeitos na via da cadeia respiratória

aeróbica (DAY, 2013). Portanto, sugere-se que a YDR286C, presente na mitocôndria e com possível atividade de peroxidase, possui algum papel relacionado com a respiração mitocondrial.

Uma maneira de determinar a função da proteína é conhecer com quais ligantes ela interage. Dados prévios do nosso grupo identificaram por espectrometria de massas uma lista de possíveis proteínas-alvo de C5orf63, através da técnica de *trapping mutant* dependente do motivo CxxC (Nakao, dados não publicados). Um dos alvos que chamou atenção é a nucleofosmina, uma proteína do nucléolo e que sofre translocação quando há estresse nucleolar, processo que é regulado pela glutathionilação da cisteína 275 (YANG et al., 2016). Uma possível hipótese era de que C5orf63 tivesse atividade da glutaredoxina, podendo regular a glutathionilação desse resíduo. Porém, como o ensaio HED não mostrou essa atividade de C5orf63 essa hipótese foi descartada.

Com a intenção de identificar as proteínas-alvo de YDR286C em leveduras, foi realizada a preparação das ferramentas para o ensaio de *trapping mutant* da YDR286C. No entanto, a insolubilidade de YDR286C tornou-se um obstáculo inesperado, pois as proteínas da superfamília das tioredoxinas são solúveis. Após as diversas estratégias e tentativas para obter a YDR286C solúvel produzida em levedura terem falhado, a alternativa bem sucedida foi expressar YDR286C em bactérias com otimização de códons raros e adição etiqueta de solubilidade MBP. Apesar de não ser um modelo mais similar possível ao seu ambiente fisiológico, a estratégia é usar essa proteína purificada em bactérias para fazer um *pulldown* com extrato mitocondrial de levedura. Para evitar a interferência da proteína MBP, de 37 kDa, nesse ensaio foi adicionado o sítio da protease TEV entre a YDR286C e MBP. Espera-se que assim sejam encontrados os parceiros moleculares, que possam dar indícios da função dessa proteína.

6 CONCLUSÃO

Foi mostrado que tanto C5orf63 quanto YDR286C possuem o domínio DUF386 conservado com o motivo CxxC, com características de glutaredoxina. Também foi possível fazer a caracterização inicial da proteína humana C5orf63, demonstrando sua termoestabilidade e possível atividade peroxidásica. Foi determinada a localização mitocondrial tanto de C5orf63 em células humanas quanto da YDR286C em leveduras. No entanto, não foi possível determinar o fenótipo das leveduras Δ YDR286C através dos ensaios de viabilidade sob diferentes condições. Foram detectados indícios de menor tempo de vida por possível influência da falta de YDR286C na funcionalidade mitocondrial. A busca por parceiros moleculares de YDR286C é desafiadora pela insolubilidade da proteína, mas a construção da proteína de fusão com a proteína MBP permitirá o prosseguimento dessa investigação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No capítulo I foi demonstrado que as três cisteínas de AIF humano são oxidáveis formando dissulfetos. Esse achado foi confirmado tanto em proteínas recombinantes quanto em células humanas. Em modelo celular a oxidação com peróxido de hidrogênio e diamida produz CLD entre moléculas de AIF ou com outras proteínas celulares, enquanto essa oxidação só é observada com diamida no modelo *in vitro*. Esses dissulfetos podem ser reduzidos pela Trx1, a qual é encontrada em pequenas quantidades na mitocôndria.

No capítulo II, foi mostrado a proteína humana C5orf63 é termoestável e possivelmente possui atividade peroxidásica. Também foi confirmada a localização mitocondrial tanto de C5orf63 em células humanas quanto da YDR286C em leveduras. Não foi possível determinar o fenótipo das leveduras Δ YDR286C através dos ensaios de viabilidade sob diferentes condições. Foi possível observar indícios de redução tempo de vida e falha de função mitocondrial de leveduras sem YDR286C no ensaio de longevidade.

8 PESPECTIVAS

Quanto ao AIF seria interessante avaliar o efeito fisiológico da oxidação de AIF a CLD. E para confirmar a atividade de peroxidase de C5orf63/YDR286C será necessário realizar outros ensaios, como o consumo direto de peróxido de hidrogênio medido a 240 nm. O efeito da deleção de YDR286C na longevidade em leveduras deverá ser repetida. Os parceiros moleculares de YDR286C serão identificados por espectrometria de massas das amostras de pull-down do extrato mitocondrial com a YDR286C-MBP. Com os alvos identificados espera-se que seja possível identificar vias metabólicas em que YDR286C faz parte evidenciando sua função.

REFERÊNCIAS

- APOSTOLOVA, N.; CERVERA, A.; VICTOR, V. *et al.* Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 2, p. 354-357, 2006.
- ARTUS, C.; BOUJRAD, H.; BOUHARROUR, A.; *et al.* AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. **EMBO Journal**, 2010.
- BALMER, Y.; VENSEL, W. H.; TANAKA, C. K.; *et al.* Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 8, p. 2642-2647, 2004.
- BANO, D.; PREHN, J. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. **EBioMedicine**, v. 30, p. 29-37, 2018.
- BENINCÁ, C.; PLANAGUMÀ, J.; DE FREITAS SHUCK, A. *et al.* A new non-canonical pathway of Gα(q) protein regulating mitochondrial dynamics and bioenergetics. **Cell Signal**. v. 26, n. 2, p. 1135-1146, 2014
- BUSHWELLER JH, ÅSLUND F, WUTHRICH K, AND HOLMGREN A. Structural and functional characterization of the mutant Escherichia coli glutaredoxin (C14----S) and its mixed disulfide with glutathione. **Biochemistry**. v.31: p.9288-9293,1992
- CARDENAS-RODRIGUEZ, M.; TOKATLIDIS, K. Cytosolic redox components regulate protein homeostasis via additional localisation in the mitochondrial intermembrane space. **FEBS Letters**, v. 591, n. 17, p. 2661-2670, 2017.
- CANDE, C. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 24, p. 4727-4734, 2002.
- CANDÉ, C, VAHSEN, NGARRIDO, C *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. **Cell Death & Differentiation**, v. 11, n. 6, p. 591-595, 2004.
- CARVALHO, A. P.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Similarities and differences in the thioredoxin superfamily. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 91, n. 3, p. 229-248, 2006.
- CHAE, H.; KIM, H.; KANG, S.; RHEE, S. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 45, n. 2-3, p. 101-112, 1999.
- CHEUNG, E.; JOZA, N.; STEENAART, N. *et al.* Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 17, p. 4061-4073, 2006.
- CHO, S. H.; LEE, C. H.; AHN, Y.; *et al.* Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂-mediated cell signaling. **FEBS Letters**, v. 560, n. 1-3, p. 7-13, 2004.

CHURBANOVA, I.; SEVRIUKOVA, I. Redox-dependent Changes in Molecular Properties of Mitochondrial Apoptosis-inducing Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 9, p. 5622-5631, 2008.

COLLET, J. F.; MESSENS, J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 13, n. 8, p. 1205–1216, 2010.

DANTAS, L.; CHAVES-FILHO, A.; COELHO, F. *et al.* Cholesterol secosterol aldehyde adduction and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase: Potential implications in ALS. **Redox Biology**, v. 19, p. 105-115, 2018.

DAUGAS, E.; NOCHY, D.; RAVAGNAN, L.; *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): A ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. **FEBS Letters**, v. 476, n. 3, p. 118–123, 2000.

DAY, M. Yeast Petites and Small Colony Variants. **Advances in Applied Microbiology**, p. 1-41, 2013.

DELETTRE, C.; YUSTE, V. J.; MOUBARAK, R. S.; *et al.* Identification and characterization of AIFsh2, a mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) isoform with NADH oxidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, 2006.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2007.

FADEEVA, N. P.; ANTIPOVA, N. V.; SHENDER, V. O.; ANUFRIEVA, K. S.; STEPANOV, G. A; *et al* Identification of Novel Interaction Partners of AIF Protein on the Outer Mitochondrial Membrane. **Acta naturae**, 2017.

FAUBERT, B.; DEBERARDINIS, R. J.; MINNA, J. D. AIF: an acquired metabolic liability in lung cancer. **Cell Research**, 2019.

FERNANDES, A.; HOLMGREN, A. Glutaredoxins: Glutathione-Dependent Redox Enzymes with Functions Far Beyond a Simple Thioredoxin Backup System. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, n. 1, p. 63-74, 2004.

FETROW, J.; SIEW, N.; DI GENNARO, J. *et al.* Genomic-scale comparison of sequence- and structure-based methods of function prediction: Does structure provide additional insight?. **Protein Science**, v. 10, n. 5, p. 1005-1014, 2001.

FOMENKO, F.; MARINO, S.; GLADYSHEV, V. Functional Diversity of Cysteine Residues in Proteins and Unique Features of Catalytic Redox-active Cysteines in Thiol Oxidoreductases. **Mol Cells**. v. 26, n.3, p.228-235, 2008.

GASDASKA, P.; OBLONG, J.; COTGREAVE, I.; POWIS, G. The predicted amino acid sequence of human thioredoxin is identical to that of the autocrine growth factor human adult T-cell derived factor (ADF): Thioredoxin mRNA is elevated in some human tumors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1218, n. 3, p. 292-296, 1994.

HALLIWELL, BARRY. Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. **Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p. 1-11, 2007.

HANDY, D. E.; LUBOS, E.; YANG, Y.; *et al.* Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. **Journal of Biological Chemistry**, 2009.

HANGEN, E.; FÉRAUD, O.; LACHKAR, S. *et al.* Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. **Molecular Cell**, v. 58, n. 6, p. 1001-1014, 2015.

HESS, D. T.; MATSUMOTO, A.; KIM, S. O.; MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2005.

HOLMGREN, A. Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of Escherichia coli glutaredoxin. **Journal of Biological Chemistry**, 1979.

HOLMGREN, A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. **Structure**, v. 3, n. 3, p. 239–243, 1995.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2014.

JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of Xylenol Orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, 1992.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. American Journal of Physiology - **Cell Physiology**, 2008.

JONES, D. P.; GO, Y. M. Redox compartmentalization and cellular stress. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 2010.

JOZA, N.; SUSIN, S.; DAUGAS, E. *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 549-554, 2001.

KLEIN, J.; LONGO-GUESS, C.; ROSSMANN, M. *et al.* The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 419, n. 6905, p. 367-374, 2002.

KOONIN, E. V. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. **Annual Review of Genetics**, 2005.

KRITSILIGKOU, P.; CHATZI, A.; CHARALAMPOUS, G. *et al.* Unconventional Targeting of a Thiol Peroxidase to the Mitochondrial Intermembrane Space Facilitates Oxidative Protein Folding. **Cell Reports**, v. 18, n. 11, p. 2729-2741, 2017.

LEE, J. H.; KIM, K.; PARK, E. H.; AHN, K.; LIM, C. J. Expression, characterization and regulation of a Saccharomyces cerevisiae monothiol glutaredoxin (Grx6) gene in Schizosaccharomyces pombe. **Molecules and Cells**, 2007.

LEONARD, S. E.; CARROLL, K. S. Chemical “omics” approaches for understanding protein cysteine oxidation in biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2011.

LEWIS, E. M.; WILKINSON, A. S.; JACKSON, J. S.; *et al.* The enzymatic activity of apoptosis-inducing factor supports energy metabolism benefiting the

growth and invasiveness of advanced prostate cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2012.

LIMA, D.; DE LIMA, T.; BALBUENA, T. *et al.* SIM-XL: A powerful and user-friendly tool for peptide cross-linking analysis. **Journal of Proteomics**, v. 129, p. 51-55, 2015.

LIMA, D.; MELCHIOR, J.; MORRIS, J. *et al.* Characterization of homodimer interfaces with cross-linking mass spectrometry and isotopically labeled proteins. **Nature Protocols**, v. 13, n. 3, p. 431-458, 2018.

LIN, J.; NAKAGAWA, A.; SKEEN-GAAR, R. *et al.* Oxidative Stress Impairs Cell Death by Repressing the Nuclease Activity of Mitochondrial Endonuclease G. **Cell Reports**, v. 16, n. 2, p. 279-287, 2016.

LORENZO, HANS KRISTIAN, SUSIN, SANTOS APENNINGER, JOSEF *et al.* Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 6, p. 516-524, 1999.

NAGY, P. Kinetics and Mechanisms of Thiol–Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 13, p. 1623-1641, 2013.

NETTO, L.; DE OLIVEIRA, M.; TAIRUM, C.; DA SILVA NETO, J. Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. *Acesso em: 2/ 12/ 2019*.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

MARINO, S.; GLADYSHEV, V. A Structure-Based Approach for Detection of Thiol Oxidoreductases and Their Catalytic Redox-Active Cysteine Residues. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 5, p. e1000383, 2009.

MEYER, K.; BUETTNER, S.; GHEZZI, D. *et al.* Loss of apoptosis-inducing factor critically affects MIA40 function. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 7, p. e1814-e1814, 2015.

MIRAMAR, M.; COSTANTINI, P.; RAVAGNAN, L. *et al.* NADH Oxidase Activity of Mitochondrial Apoptosis-inducing Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16391-16398, 2001.

NAKAO, L.; EVERLEY, R.; MARINO, S. *et al.* Mechanism-based Proteomic Screening Identifies Targets of Thioredoxin-like Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 9, p. 5685-5695, 2015.

NAGY, P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. **Antioxidants and Redox Signaling**, 2013.

NORBERG, E.; GOGVADZE, V.; OTT, M.; *et al.* An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. **Cell Death and Differentiation**, 2008.

NORBERG, E.; GOGVADZE, V.; VAKIFAHMETOGLU, H.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Oxidative modification sensitizes mitochondrial apoptosis-

inducing factor to calpain-mediated processing. **Free Radical Biology and Medicine**, 2010.

OTERA, H.; OHSAKAYA, S.; NAGAURA, Z.; ISHIHARA, N.; MIHARA, K. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 7, p. 1375-1386, 2005.

PARRELLA, E.; LONGO, V. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease. **Methods**, v. 46, n. 4, p. 256-262, 2008.

PARRISH, J.; LI, L.; KLOTZ, K.; et al. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. **Nature**, 2001.

POOLE, L. Formation and Functions of Protein Sulfenic Acids. **Current Protocols in Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 17.1.1-17.1.15, 2003.

RAO, S.; MONDRAGÓN, L.; PRANJIC, B.; et al. AIF-regulated oxidative phosphorylation supports lung cancer development. **Cell Research**, 2019.

RAVAGNAN, L.; GURBUXANI, S.; SUSIN, S. A.; et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. **Nature Cell Biology**, 2001.

RHEE, S.; WOO, H. Multiple Functions of Peroxiredoxins: Peroxidases, Sensors and Regulators of the Intracellular Messenger H₂O₂, and Protein Chaperones. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 781-794, 2011.

RUDYK, O.; EATON, P. Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. **Redox Biology**, 2014.

SEVRIOUKOVA, I. Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 12, p. 2545-2579, 2011.

SHELAR, S.; KAMINSKA, K.; REDDY, S. *et al.* Thioredoxin-dependent regulation of AIF-mediated DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 125-136, 2015.

SHEN, S.; GUO, M.; XIONG, Z. *et al.* AIF inhibits tumor metastasis by protecting PTEN from oxidation. **EMBO reports**, v. 16, n. 11, p. 1563-1580, 2015.

SHOULDICE, S.; HERAS, B.; WALDEN, P. *et al.* Structure and Function of DsbA, a Key Bacterial Oxidative Folding Catalyst. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 9, p. 1729-1760, 2011.

SIES, HELMUT, BERNDT, CARSTENJONES, DEAN P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715-748, 2017.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, 1992.

SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; CASTEDO, M.; et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. **Journal of Experimental Medicine**, 1996.

SUSIN, S.; LORENZO, H.; ZAMZAMI, N. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441-446, 1999.

SCHWARZ, C.; NICKELSEN, J. 2D Diagonal Redox SDS-PAGE of Proteins <http://www.bio-protocol.org/e781>, Vol 3, Iss 11, 2013.

TROULINAKI, K.; BÜTTNER, S.; MARSAL COTS, A. *et al.* WAH-1/AIF regulates mitochondrial oxidative phosphorylation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cell Death Discovery**, v. 4, n. 1, 2018.

VAHSEN, N.; CANDÉ, C.; BRIÈRE, J. *et al.* AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 23, p. 4679-4689, 2004.

VAN EMPEL, V. P. M.; BERTRAND, A. T.; VAN DER NAGEL, R.; *et al.* Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation. **Circulation research**, 2005.

VÖGTLE, F.; BURKHART, J.; RAO, S. *et al.* Intermembrane Space Proteome of Yeast Mitochondria. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 12, p. 1840-1852, 2012.

WANG, X.; YANG, C.; CHAI, J.; SHI, Y.; XUE, D. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 2002.

WANG, Y.; AN, R.; UMANAH, G. K.; *et al.* A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. **Science**, 2016.

WINTERBOURN, C. The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, **Methods Enzymol.** Part C, p. 3-25, 2013.

WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, 2003.

YADAV, S.; KUMARI, P.; KUSHWAHA, H. R. Sequence and structural characterization of Trx-Grx type of monothiol glutaredoxins from *Ashbya gossypii*. **Bioinformation**, 2013.

YE, H.; CANDE, C.; STEPHANOU, N. C.; *et al.* Dna binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. **Nature Structural Biology**, 2002.

YU, S.-W.; WANG, Y.; FRYDENLUND, D. S.; *et al.* Outer Mitochondrial Membrane Localization of Apoptosis-Inducing Factor: Mechanistic Implications for Release. **ASN Neuro**, 2009.

ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A.; MARCHETTI, P.; *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, 1996.

ZHU, C.; WANG, X.; DEINUM, J.; *et al.* Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. **Journal of Experimental Medicine**, 2007.

ZHU, LIPING, LU, YANKAIZHANG, JIWEI *et al.* Subcellular Redox Signaling. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 385-398, 2017.

ANEXO 1- MANUSCRITO CAPÍTULO I

Oxidation of apoptosis-inducing factor (AIF) to disulfide-linked conjugates

Sze M. Lo¹, Pierina A. Martinez¹, Emerson F. Marques², Sayuri Miyamoto², Glaucio Valdameri³, Silvio M. Zanata¹, Lia S. Nakao^{1}*

¹Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Centro Politécnico, 81531-980, Curitiba, Paraná Brazil

²Department of Biochemistry, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000, São Paulo, Brazil

³Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Federal University of Paraná, 80210-170 Curitiba, PR, Brazil

***Corresponding author:** Lia S. Nakao, Department of Basic Pathology, room 153, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, 81531-980, Tel: + 55 41 3361-1561, Email: lia.nakao@ufpr.br

Highlights

- AIF cysteine residues can be oxidized, forming disulfide-linked conjugates (DLC).
- All three cysteines of AIF are relevant to the formation of DLC *in vitro* and in cells.
- Thioredoxin-1 is able to disrupt the DLC *in vitro*.

Abstract

Apoptosis-inducing factor (AIF) is a flavoprotein and essential partner of the CHCHD4 redox protein during the mitochondrial intermembrane space import machinery. Mammalian AIF has three cysteine residues, which have been poorly studied. Previous reports have evidenced a redox interaction between AIF and thioredoxin 1 (Trx1), particularly after oxidant conditions. Therefore, we asked whether the cysteine residues of the human AIF could be oxidized. Our data showed that overexpressed wt AIF in HEK293T cells, as well as recombinant wt AIF, can be oxidized to disulfide-linked conjugates (DLC). Expression of C256S, C317S or C441S AIF mutants severely inhibited DLC formation in cells exposed to oxidants. *In vitro*, DLC formation was completely precluded with C256S and C441S AIF mutants and partially inhibited with the C317 mutant. Cells with lower expression of Trx1 produced more AIF DLC than those with normal levels, and *in vitro*, Trx1 was able to decrease the amount of AIF DLC. Finally, confocal results indicated that a fraction of Trx1 is present in mitochondria. Overall, these data provide evidence that all three cysteine residues of AIF can be oxidized to DLC, which can be disrupted by mitochondrial Trx1.

Keywords

Apoptosis-inducing factor 1 (AIF1), thioredoxin 1 (Trx1), diamide, disulfide, mitochondria.

1. Introduction

Human apoptosis-inducing factor-1 (AIF1) is a ubiquitous 62 kDa-mitochondrial flavoprotein, inserted in the inner membrane, with the majority of the C-terminus facing the intermembrane space (IMS) (Otera *et al.*, 2005). Upon specific apoptotic stimuli, AIF is further cleaved to the 57 kDa-apoptogenic form that is then released to cytosol and nucleus, where it induces DNA fragmentation and caspase-independent apoptosis (Susin *et al.*, 1999). Despite its well-characterized involvement in apoptosis (Joza *et al.*, 2001; Sevrioukova, 2011; Bano and Prehn, 2018), physiological roles of AIF have also been emerging. By studying the Harlequin mouse, a strain in which AIF expression is *ca.* 80% reduced (Klein *et al.*, 2002), or cells with low expression of AIF, it was demonstrated that AIF deficiency impairs mitochondrial oxidative phosphorylation, due to a decreased content of complex I subunits (Vahsen *et al.*, 2004; Apostolova *et al.*, 2006). Later, AIF was shown to be necessary for CHCHD4 protein expression in the IMS. In the absence of CHCHD4, the expression of several respiratory complex subunits is compromised (Hangen *et al.*, 2015; Meyer *et al.*, 2015), leading to the observed impaired respiration and oxidative phosphorylation (Vahsen *et al.*, 2004; Apostolova *et al.*, 2006) and possibly to aberrant mitochondria morphology, described first in AIF-deficient neurons (Cheung *et al.*, 2006).

Cells from the Harlequin mouse also show increased oxidative damage and increased susceptibility to peroxide-induced death, suggesting that AIF has antioxidant activity (Klein *et al.*, 2002). Redox properties of AIF are mainly attributed to its binding to NAD(P)H (Miramar *et al.*, 2001), forming a stable charge-transfer complex with FAD, which points to AIF's low ability to transfer electrons from NAD(P)H to other molecules (Churbanova and Sevrioukova, 2008). The role of its cysteine residues in redox processes has, however, received little attention. AIF has three cysteine residues, located at positions 256, 317 and 441 in the human sequence. Under physiological situation, these cysteine residues are in the reduced form (Miramar *et al.*, 2001), and with the exception of the C441, are predicted to be not exposed at the AIF surface (Sevrioukova, 2011). Nonetheless, some findings indicate that the cysteine residues may have redox roles in AIF: the incubation of recombinant AIF with the thiol reagent p-chloromercuriphenylsulfonic acid (pCMPS) decreases its apoptogenic activity (Miramar *et al.*, 2001), indicating that at least one

of the cysteine is able to be oxidized. Also, we have recently detected AIF as a thioredoxin 1 (Trx1) target, using the trapping mutant method, in which the resolving cysteine of the CxxC motif is mutated (Nakao *et al.*, 2015). The interaction of Trx1 with AIF was then demonstrated to depend on at least two cysteine residues of AIF (Shelar *et al.*, 2015). A recent work demonstrated that the *C. elegans* AIF homolog WAH forms a disulfide-linked dimer after oxidation (Lin *et al.*, 2016). Here we show that both recombinant AIF and AIF-overexpressing cells can produce AIF disulfide-linked conjugates (DLC) under oxidative conditions, and provide evidence that Trx1 can reduce these oligomeric forms to monomeric AIF.

2. Material and Methods

2.1. Construction of pCI-neo wild-type and mutant AIF-HA plasmids. The coding sequence corresponding to amino acids 1-613 of the human AIF (NM_004208.3) was amplified from a vector (Harvard Plasmid Database, Clone ID #HsCD00347250) kindly provided by Dr Vadim Gladyshev (Brigham and Women's Hospital, Boston, USA) with Platinum Pfx polymerase (Invitrogen) and cloned into pCI-neo vector (Promega), between EcoRI and Sall restriction sites. A sequence of the human Influenza Hemagglutinin (HA) was added in the reverse primer (Supplementary Table 1) to produce a HA tag at the C-terminus of the protein. The pCI-neo AIF C256S-HA, AIFC317S-HA and AIF C441S-HA plasmids were obtained by site-directed mutagenesis using the wild-type sequence as template. Amplification with mutagenic primers (Supplementary Table 2) was performed with Pfu Ultra High Fidelity DNA polymerase AD (Agilent), followed by digestion with DpnI (Fermentas). Competent Novablue cells (Novagen) were used to select the mutant plasmids. The mutations were verified by DNA sequencing.

2.2. HEK293T cells treatment. Human embryonic kidney cells (HEK293T) were routinely cultured in MEM (Sigma) with 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 µg/mL gentamicin. Cells were transfected, using a calcium phosphate-based method, with AIF-HA, AIF C256S-HA, AIF C317S-HA and AIF C441S-HA pCIneo vectors or with the empty vector. Typically, we used 1.3 µg of the wild type AIF-HA plasmid and 1.7 µg of the mutant plasmids to transfect cells in a 35 mm-dish. After 48 h, cells were treated in PBS with 0.5 mM hydrogen peroxide for 2 h or 75 µM diamide for 10 minutes at 37°C. They were washed and collected with 40 µL sample buffer/~4x10⁵ cells. Part of this suspension was treated with 5% β-mercaptoethanol (βME). All samples were immediately submitted to electrophoresis.

2.3. Western blot. Cell extracts were separated by 10% SDS-PAGE in Tris-glycine buffer and transferred to nitrocellulose membrane (GE Healthcare) by semi-dry transfer. The membrane was blocked with 5% nonfat milk in TBS containing 0.05% Tween 20. The primary antibodies employed were anti-HA (1:500, Y11, sc-805, Santa Cruz), anti-AIF (1:1,000, H300, sc-5586, Santa Cruz), anti-Trx1 (1:1,000, #559969 BD Pharmingen) and anti-β actin (1:10,000, A5441, Sigma), while the

secondary antibodies were anti-mouse immunoglobulin (1:3,000, A4416, Sigma) and anti-rabbit immunoglobulin (1:4,000, A0545, Sigma). After an overnight incubation with the primary antibodies and a 1 h-incubation with the secondary antibody, the membrane was washed and the reaction was developed with the SuperSignal West Pico kit (Pierce). Chemiluminescence was detected on autoradiography films (Carestream or Thermo).

2.5. Recombinant wild-type and mutant hAIF Δ 1-120 and Trx. The human AIF cDNA lacking the mitochondrial leading sequence (MLS) (hAIF Δ 1-120) and the complete human Trx sequence, cloned into pET28a (Novagen), were expressed in BL21 cells and purified in native buffer as described (Nakao *et al*, 2015). The hAIF Δ 1-120 C256S, hAIF Δ 1-120 C317S and hAIF Δ 1-120 C441S plasmids were obtained as described for the pCI-neo AIF-HA mutant plasmids. The purified hAIF Δ 1-120 proteins (wild-type and mutants) were N-terminally tagged with 6xHis and were able to spontaneously incorporate FAD during their bacterial expression, as observed by the bright yellow solution eluted from the Ni-column. Protein concentration was determined with Bradford reagent.

2.5. Oxidation of recombinant wild type and mutant hAIF Δ 1-120. The recombinant hAIF Δ 1-120 proteins (10 μ M) were oxidized with 2 mM hydrogen peroxide or with 0.5 mM diamide for 15 minutes at 37°C in PBS. These samples were then immediately submitted to a 10% SDS-PAGE in non-reducing or reducing (5% β ME) conditions, and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (BRL Life Technologies).

2.6. Two-dimensional redox SDS-PAGE. Recombinant hAIF Δ 1-120 was oxidized with diamide as described above and separated in non-reducing 10% SDS-PAGE. The lane was excised, reduced with 0.1 M DTT for 15 minutes at room temperature and washed twice with running buffer (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3). To prevent reoxidation, thiols were alkylated with 0.1 M iodoacetamide for 15 minutes at room temperature in the dark. After two washes, the gel lane was placed horizontally, in contact with the second gel. The empty space was filled with 0.5% agarose with 0.75 g/L bromophenol blue. Protein marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) was applied to a filter

paper and inserted into agarose before solidify. Gel was stained with Coomassie Blue (Schwarz and Nickelsen, 2013).

2.7. *In vitro* interaction of AIF and Trx1. Reduced human Trx1 was obtained by incubating Trx1 (100 μ M) with 2 mM DTT for 15 minutes at room temperature in PBS. DTT was removed with a 3-kDa cutoff spin column (Merck Millipore). Recombinant hAIF Δ 1-120 (10 μ M) was oxidized with 0.5 mM diamide for 15 minutes 37 °C. Diamide was removed by ultrafiltration with a 30-kDa cutoff spin column (Merck Millipore). Then AIF was incubated with the reduced Trx1 (40 μ M) for 15 minutes at 37 °C in 50 mM Tris pH 7.2. Reaction was stopped with addition of 5x sample buffer. Samples were separated in 10% SDS-PAGE under reducing or non-reducing conditions and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.8. Trx1 knockdown and AIF overexpression in HEK293T. Cells (4×10^5) were seeded in 35 mm dish. On the next day, they were double-transfected with 10 nM siGENOME Smart Pool TXN (Cat# M-006340-01, Dharmacon) or the control (siGENOME non-targeting Control siRNA D-001210-02-20, Dharmacon), and 2 μ g pCI-neo AIF-HA vector with 4 μ L Dharmafect Duo Reagent (Cat #T-2010-03, Dharmacon) in 100 μ L Opti-MEM (Gibco). Transfection medium was changed after 24 hours. Seventy-two hours after transfection, cells were submitted to oxidant treatments. Cells were collected in sample buffer and extracts were analyzed by Western Blot.

2.9. Confocal immunofluorescence. HeLa cells (human cervical carcinoma) were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and 50 μ g/mL gentamicin, at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Cells (3×10^4) were seeded on 13 mm-diameter cover slips (Knittel Glass). On the next day, they were transfected with the AIF-HA constructs or pCI-neo Trx1-HA (Nakao *et al.*, 2015) and pCDNA 3-MtDsRed (Benincá *et al.*, 2014) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Typically, 100 μ L opti-MEM containing 0.4 μ g of plasmids and 0.8 μ L Lipofectamine were added to cells for 5 hours. Forty eight hours after transfection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, incubated with 0.1 M glycine for 10 minutes, then with 5% bovine serum albumin in 0.1% Triton X-100, and with the antibodies: anti-HA (1:500; C29F4, Cell Signaling),

anti-AIF (1:100, H300, sc-5586, Santa Cruz) or anti-Trx1 (1:300, #559969, BD Pharmingen) at 4°C overnight followed by anti-rabbit immunoglobulin-Alexa Fluor 488 (A11008, Molecular Probes), anti-rabbit immunoglobulin-Alexa Fluor 647 (A28181, Molecular Probes) and anti-mouse immunoglobulin-Alexa Fluor 488 (A11001, Molecular Probes). Coverslips were mounted in buffered glycerol solution with DAPI on glass slides. Images were captured in a multifoton confocal microscope A1 MP+ (Nikon) at CTAF/UFPR. Orthogonal view from different planes (x/y, x/z or y/z) of the confocal images were created using ImageJ software.

2.10 Sample preparation for MS and MS/MS analysis The gel bands (~70 kDa and 170 kDa) were destained (50% acetonitrile, 2% formic acid in water) and the protein spots were alkylated with 50 mM iodoacetamide (GE, RPN6302V) for 1 h at 37°C and digested with trypsin Gold Promega (protein to trypsin ratio 1:20) for 17 h. Isolated hAIF Δ 1-120 was digested in the same condition as the bands. The peptides were extracted using stage tips, evaporated to dryness and dissolved in 0.1% formic acid in acetonitrile. Samples were analyzed by nLC-ESI-MS/MS (Dantas *et al.*, 2018). Cross-links were analyzed using Spectrum Identification Machine for Cross-Linked Peptides (SIM-XL) software (Lima *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2018).

3. Results

3.1. AIF forms disulfide-linked conjugates (DLC) in human cells

To investigate if AIF cysteine residues are able to engage in disulfide bonds, we transfected HEK293T with a vector encoding a HA-tagged wild-type (WT) AIF fusion protein and incubated cells with 0.5 mM hydrogen peroxide for 2 h or with 75 μ M diamide for 10 minutes. As demonstrated by the immunoblotting with anti-HA antibody under a non-reducing condition, the control condition (no oxidant) presents, in addition to the monomeric AIF-HA (~62 kDa), AIF-HA conjugates with apparent molecular mass > 100 kDa (Figure 1). Hydrogen peroxide slightly increased the amount of those bands, and diamide promoted a more significant effect. A reducing condition abolished the conjugates, which indicates that the conjugates are composed of disulfide-bonded AIF-HA, herein referred as disulfide-linked conjugates (DLC). The smeared pattern of the detected DLC indicates that AIF-HA is able to react with several cellular proteins. Detection of those DLC even without treatment with oxidants suggests that the basal cellular metabolism can induce the formation of AIF-HA DLC.

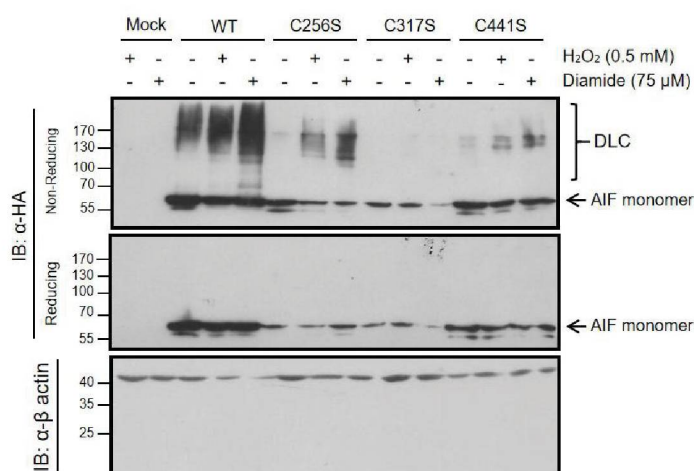


Figure 1. AIF forms disulfide-linked conjugates (DLC). HEK293T cells were transfected with the empty vector (mock) or with vectors encoding AIF-HA (WT), AIF C256S-HA, AIF C317S-HA or AIF C441S-HA proteins. After 48 h of transfection, they were incubated with 0.5 mM hydrogen peroxide for 2 h or with 75 μ M diamide for 10 minutes at 37°C. Total cell proteins (9 μ L of 40 μ L) were separated by 10% SDS-PAGE under non-reducing or reducing (5% β -ME) conditions, blotted into a nitrocellulose membrane and incubated with the indicated antibodies.

The three cysteine residues in the primary sequence of human AIF are located at amino acid positions 256, 317 and 441. To analyze which of them participates in

the observed disulfide bonds, mutant AIF plasmids were constructed in which each cysteine residue was mutated to serine. Cells were transfected with the mutant vectors and exposed to the same oxidant conditions as the WT AIF-HA. Compared with the WT AIF-HA overexpression, expression of the mutant AIF proteins was lower (data not shown), suggesting that such mutations interfere either with protein expression or stability. To overcome this issue, we transfected cells with higher amounts of the mutant AIF plasmids. Considering the relative amounts between DLC and monomer AIF-HA (in the reducing condition), substitution of all three cysteine residues severely compromised DLC formation under basal condition, (Figure 1). After oxidation, AIF C256S-HA displayed a decreased amount of DLC than AIF-HA, whereas in AIF C317S-HA and C441S-HA DLC were almost absent (Figure 1). Similar to the WT AIF-HA, DLC were not detected under a reducing condition. These data indicate that the three AIF cysteine residues have a role in disulfide formation in cells.

3.2. Oxidation of recombinant AIF induces the formation of DLC

To further investigate the oxidation of AIF molecule to disulfide, we used a recombinant AIF lacking the first 120 amino acids (hAIF Δ 1-120) (Susin *et al.*, 1999, Nakao *et al.*, 2015). Analysis of a non-reducing SDS-PAGE showed that, under control condition, the monomeric form (detected at ~58 kDa) and a minor band at ~70 kDa were detected (Figure 2A). After oxidation with 0.5 mM diamide for 15 minutes, the intensity of the 70 kDa band increased, and a prominent band with molecular mass of ~170 kDa was also observed. In contrast to the effect observed in HEK293T cells, hydrogen peroxide (0.5-2 mM for 15 min at 37 °C) did not oxidize hAIF Δ 1-120 (data not shown). Under a reducing SDS-PAGE only the monomer was detected (Figure 2B), indicating that the 70 and 170 kDa bands are DLC. The possibility that those DLC are composed of recombinant AIF bound to bacterial proteins was raised. A bidimensional gel, with a non-reducing followed by a reducing run showed that all DLC consisted of hAIF Δ 1-120 molecules only, since no other protein was detected after the reducing condition (Figure 2C). Next, a mass spectrometry analysis with trypsin-digested peptides of the 70 and 170 kDa DLC was performed. We applied Spectrum Identification Machine (SIM-XL) software to identify disulfide bond sites in AIF. A disulfide between cysteine residues 256 and 317 was

detected in the 70 kDa DLC, while 2 disulfides, between residues 256 and 317 and between residues 256 and 441 were found in the 170 kDa DLC (Table 1, Supplementary Figures 1 and 2), although formation of other undetected disulfides cannot be ruled out.

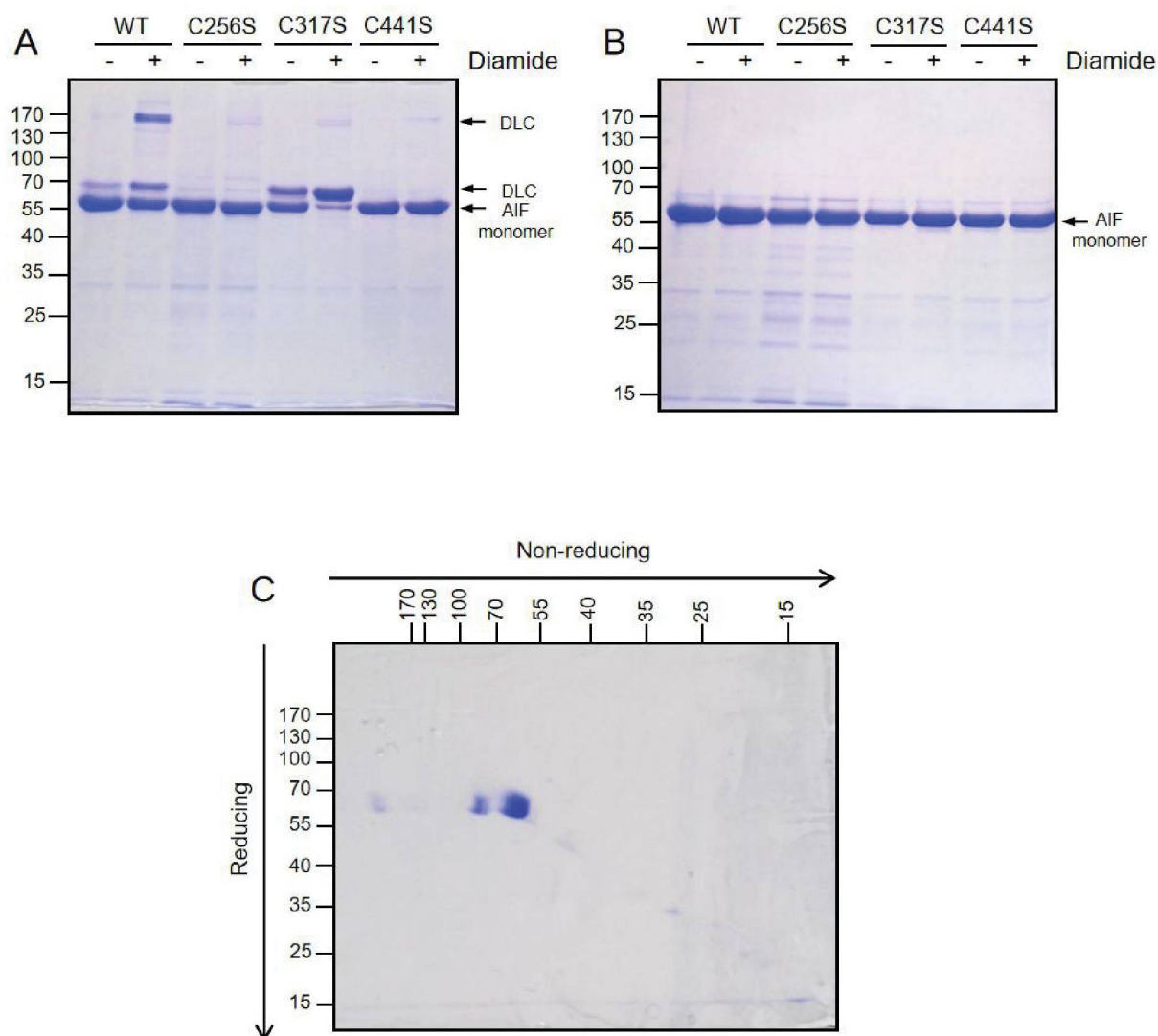


Figure 2. Diamide induces formation of disulfide-linked conjugates of hAIFΔ1-120. 4.8 μg of wild-type (hAIF Δ1-120) and mutant recombinant proteins hAIF Δ1-120 C256S, hAIF Δ1-120 C317S and hAIF Δ1-120 C441S were incubated in the presence or absence of 0.5 mM diamide for 15 minutes at 37°C, followed by electrophoretic separation by SDS-PAGE (10% acrilamide) in non-reducing (A) or (B) reducing (5% beta-mercaptoethanol) conditions. (C) Two dimensional redox gel of 4.8 μg of hAIFΔ1-120 incubated with diamide and submitted to a non-reducing condition (first dimension) and reducing condition (second dimension). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

Table 1. Characterization of hAIFΔ1-120 peptides containing disulfide bonds

Band	AIF trypsin fragments disulfide linked peptide	Disulfide bond	Calculated <i>m/z</i>	Observed <i>m/z</i>	Error ppm
~70 kDa	^{2 5 6} C L I A T G G T P R - SITIIGGGFLGSELA ³¹⁷ CALGR ^a	C256-C317	730.8900 (4+)	730.8895 (4+)	0.7
~170 kDa	^{2 5 6} C L I A T G G T P R - SITIIGGGFLGSELA ³¹⁷ CALGR ^a	C256-C317	730.8900 (4+)	730.8908 (4+)	1.1
	^{2 5 6} C L I A T G G T P R - SNIWVAGDAA ⁴⁴¹ CFYDIK ^b	C256-C441	690.3386 (4+)	690.3367 (4+)	2.7

^a C₁₂₆H₂₁₄N₃₆O₃₉S₂ exact mass 2919.5310; ^b C₁₂₂H₁₈₈N₃₂O₃₇S₂ exact mass 2957.3245

To confirm the role of each cysteine residue in DLC formation, we analyzed hAIFΔ1-120 C256S, C317S or C441S recombinant proteins. After incubation with diamide, production of the 170 kDa DLC was severely affected by all mutations (Figure 2A), consistent with data with human cells (Figure 1) and with mass spectrometry results, which showed that all 3 cysteine residues engage in disulfide in the 170 kDa DLC (Table 1). Replacement of cysteines 256 or 441 by serine residues precluded the formation of the 70 kDa DLC, in the absence or presence of oxidants. This result confirms that C256 is involved in the 70 kDa DLC, and indicates that C441 is also involved, but its disulfide could not be detected by mass spectrometry. The C317S mutant, however, displayed a peculiar behavior. Even in the absence of oxidant, this mutation led to an increased amount of the 70 kDa DLC, which became prominent after diamide incubation. Although mass spectrometry analysis detected the cysteine 317 in the 70 kDa DLC, this finding suggests that C317S mutation promotes to a structural modification in the recombinant protein that may increase the reactivity of the remaining cysteine residues. Overall, these data indicate that all the three cysteine residues engage in disulfide bonds in hAIFΔ1-120, forming DLC with apparent molecular mass of 70 and 170 kDa.

3.3. Role of Trx1 in AIF DLC reduction

Because Trx1 is a disulfide reductase protein and results from our group and from others have shown that AIF1 interacts with Trx1, we assessed whether Trx1 could reduce the hAIF Δ 1-120 DLC produced by diamide. Incubation of 10 μ M oxidized hAIF Δ 1-120 with 40 μ M recombinant human Trx1 led to the disappearance of the 170 kDa band and to a decrease in the 70 kDa band amount (Figure 3A). Incubation with 60 μ M Trx1 induced a complete disappearance of both DLC (data not shown). Such high concentrations of Trx1 were employed since the regenerating system (thioredoxin reductase 1/NADPH) was absent in the reaction mixture. These results show that Trx1 can reduce the disulfide bonds produced in hAIF Δ 1-120. To analyze the effect of Trx1 in DLC in cells, HEK293T were transfected with siRNA Trx1 and pCI-neo AIF-HA and treated with oxidants. As expected, exposure of scrambled siRNA-transfected cells to oxidants promoted the formation DLC. Cells with lower levels of endogenous Trx1 showed higher amounts of AIF-HA DLC both in oxidizing and basal conditions (Figure 3B). This result indicates that Trx1 is relevant to the cellular antioxidant system, either as a direct antioxidant, reacting with the exogenous oxidants or as a reductant of oxidized proteins, such as its known targets or AIF's DLC.

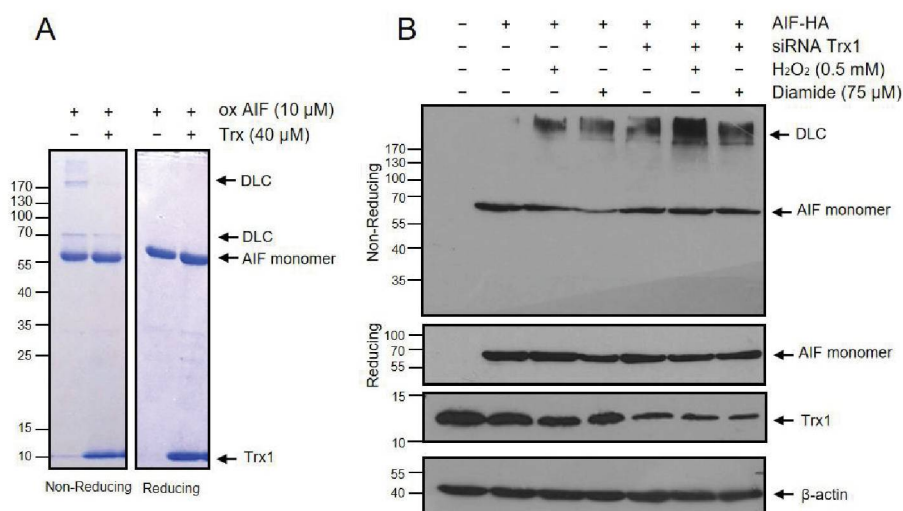


Figure 3. Trx1 has a role in AIF DLC reduction. (A) hAIF Δ 1-120 (10 μ M) was incubated with 0.5 mM diamide for 15 minutes at 37°C. Reduced recombinant human Trx1 (40 μ M) was incubated with the hAIF Δ 1-120 for more 15 minutes at 37°C. Samples were resolved by 10% SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) HEK293T were transfected with 2 μ g AIF-HA vector and 10 nM siRNA Trx1 or with scrambled siRNA and treated with 0.5 mM hydroxide peroxide for 2 h or 75 μ M diamide for 10 minutes. Total protein extract were separated by 12% or 15% SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions, blotted into a nitrocellulose membrane and incubated with the indicated antibodies.

3.4. AIF and Trx1 interaction

Since AIF is a mitochondrial protein and Trx1 is localized to the cytosol, we first investigated if enforced AIF-HA expression might induce an aberrant localization. Thus, we analyzed the wild-type, as well as the mutants AIF-HA-overexpressing HeLa cells to determine their cellular localization. The immunofluorescence results confirmed the mitochondrial expression of all AIF-HA proteins (Supplementary Figure 3). Some effects of the oxidants were also observed. In all overexpressing cells, independently of the construct transfected, hydrogen peroxide (0.5 mM) induced mitochondrial fragmentation and diamide (75 μ M) induced cell shrinkage. No translocation to nuclei was observed, possibly due to the short time points. Interestingly, the AIF mitochondrial distribution was not altered by oxidant conditions that caused DLC formation (Supplementary Figure 3).

Then, we investigated whether a fraction of Trx1 could be found in mitochondria. Several reports have been demonstrated the presence of cytosolic redox proteins in mitochondria, such as phosphatase and tensin homolog on chromosome ten (PTEN) (Shen *et al.*, 2015) and glutathione peroxidase 3 (Gpx3) (Kritsiligkou *et al.*, 2017). We performed an immunofluorescence assay to investigate a possible co-localization of AIF and Trx1 in mitochondria. As expected, AIF immunostaining displayed a mitochondrial tubular pattern, while Trx1 was found predominantly in the cytosol. However, analysis of the confocal plan revealed a fraction of Trx1 co-localizing with AIF, evidencing a mitochondrial localization (Figure 4A). The mitochondrial localization of AIF was attested by its co-localization with the mitochondrial targeted fluorescent protein MtDsRed (Figure 4A). An orthogonal view of the xz and yz planes confirmed this finding (Figure 4B). Thus, these data indicate that a fraction of the cellular Trx1 is present in the mitochondria.

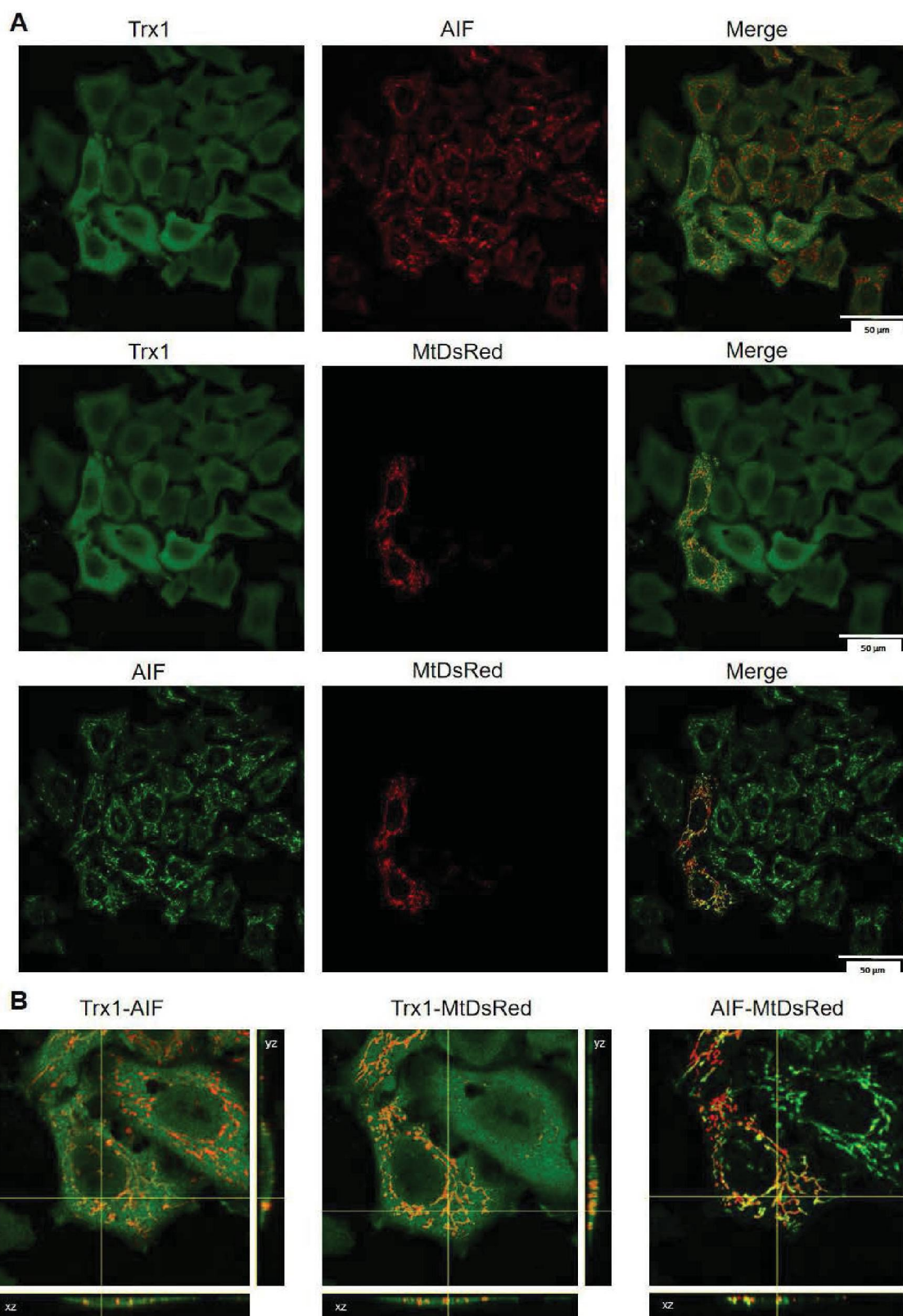


Figure 4. Thioredoxin 1 mitochondrial localization. HeLa cells were transfected with pCI-neo Trx1-HA and pcDNA 3-MtDsRed plasmids. Forty-eight hour later, cells were fixed and incubated overnight with anti-Trx1 and anti-AIF followed by anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488 and anti-mouse IgG-Alexa Fluor 647, respectively. Panel A: overview of the cytosolic and mitochondrial localization of Trx1 and its co-localization with AIF or mitochondrial targeted fluorescent protein MtDsRed. Panel B: orthogonal views of amplified xz and yz planes of images shown in A. Arrows at the merged images indicate regions of co-localization of Trx1 with mitochondria or AIF. Scale bar: 50 μ m.

5. Discussion

By combining *in vitro* and cellular models, the present study demonstrated that AIF cysteine thiols can be oxidized to disulfides, producing reversible DLC. In HEK293T cells, the extensive amount of DLC with molecular mass ranging from ~120 to ~170 kDa, in addition to a less prominent band at 70 kDa particularly after incubation with diamide, indicates that AIF is susceptible to form disulfides with many cellular proteins, even in the absence of exogenous oxidants. To further explore cysteine reactivity in AIF molecules, a recombinant hAIF Δ 1-120 was employed. Although the use of recombinant proteins is, in principle, straightforward, recombinant AIF proteins have been shown to display altered NAD(P)H-dependent redox reactivities, depending on the N-terminus sequence and on their ability to naturally fold and bind FAD (Churbanova and Sevrioukova, 2008). Our recombinant hAIF Δ 1-120 was able to spontaneously bind FAD, as observed by the bright yellow solution eluted from the purification column, thus indicating that it was naturally folded and likely kept the physiological properties. However, results must be interpreted carefully, given that it is a truncated cytosolic and not the IMS AIF form (Δ 1-52) (Otera *et al.*, 2005). The *in vitro* results confirmed that hAIF Δ 1-120 can be oxidized by diamide producing two major DLC, with estimated molecular mass of ~70 and ~170 kDa, involving the 3 cysteine residues. The number of crosslinked hAIF Δ 1-120 molecules in each DLC, however, could not be assigned with the present results. A recent study with *C. elegans* AIF homolog WAH1 showed that it can be oxidized to a disulfide-linked dimer. Monomeric WAH1 is a 60 kDa protein that contains 6 cysteine residues, and is required for the correct maintenance of the oxidative phosphorylation in *C. elegans*, similar to the mammalian AIF (Troulinaki *et al.*, 2018). Upon oxidation by hydrogen peroxide, it produces a disulfide-linked dimer, which runs electrophoretically as a band of ca.170 kDa (Lin *et al.*, 2016). Mass spectrometry data identified 3 disulfides in this WAH1 dimer: intermolecular disulfide

between C345 residues, and intra or intermolecular disulfides between C345-C240 and C345-C535. In addition, an oxidized monomer that runs with the same molecular mass as the reduced monomer was also detected. The cysteine residues engaged in the intramolecular disulfides in this monomer are the same involved in the dimer disulfides, indicating that those residues are the most reactive in WAH (Lin *et al.*, 2016). These findings, as our data, support the notion that 3 cysteine residues in AIF/WAH1 are oxidized to disulfides, producing DLC *in vitro*. Based on the apparent molecular mass, we can suggest that the 170 kDa DLC is formed by 3 or 4 hAIF Δ 1-120 molecules. The assignment of the 70 kDa DLC is also challenging, since 70 kDa is lower than the molecular mass expected for a dimer, unless the dimer has more than one disulfide bond, leading to a more compact conformation and faster electrophoretic migration.

The physiopathological impact of the DLC was not investigated here. Because cells are equipped with a dedicated set of proteins to deal with hydrogen peroxide (Winterbourn, 2013), and because AIF cysteine residues, except C441, are not solvent exposed (Sevrioukova, 2011) it is unlikely that AIF would function as a hydrogen peroxide detoxifying protein. Rather, its oxidation to DLC may be the result of excessive production of oxidants. Hydrogen peroxide is a physiological oxidant, produced in many cellular sites, particularly in mitochondria. Therefore, we can propose that such AIF DLC will be produced *in vivo* when local concentrations of hydrogen peroxide rise. In this oxidized state, AIF physiological functions will possibly be modified. For instance, AIF has been shown to be crucial for CHCHD4 import to mitochondria (Hangen *et al.*, 2015; Meyer *et al.*, 2015), and its interaction with CHCHD4 depends on AIF conformation (Hangen *et al.*, 2015). Thus, oxidation of AIF to DLC may decrease the availability of functional AIF. In this context, an interesting perspective that arouse from our study is that Trx1 may be relevant to control the DLC content in cells, since lower levels of cellular Trx1 led to the detection of a higher content of DLC promoted by both hydrogen peroxide and diamide. The most obvious interpretation of this result is that Trx1 directly reacts with these oxidants, preventing AIF oxidation. Alternatively, it suggests that Trx1 is relevant to reduce the DLC. Indeed, recombinant reduced Trx1 was able to disrupt the DLC produced by diamide in hAIF Δ 1-120. Overall, this result is consistent with previous findings showing that Trx1 interacts with AIF in cellular models. AIF binds to Trx1, with an interaction involving the nucleophilic cysteine of the Trx1 CxxC motif and enhanced

by hydrogen peroxide (Nakao *et al.*, 2015), and also involving two cysteine residues of the AIF molecule (Shelar *et al.*, 2015). Interestingly, interaction between AIF and Trx1 is disrupted by sub lethal concentrations of hydrogen peroxide or diamide, but increases during the recovery period (Shelar *et al.*, 2015), pointing to a role of Trx1 in restoring AIF redox status. Accordingly, our data revealed that co-localization of Trx1 and mitochondrial markers were evident, confirming a proteomic finding that Trx1, in addition to thioredoxin reductase 1, is present in the IMS of yeast mitochondria (Vögtle, *et al.*, 2012). Of note, once we can detect DLC in cells under basal conditions, it would be strategically important to maintain a fraction of the cellular Trx1 in the mitochondria. Besides Trx1, other cytosolic proteins have also been found in mitochondria, particularly the IMS (Kritsiligkou *et al.*, 2017), which indicates that IMS is a critical redox environment (Cardenas-Rodriguez and Tokatlidis, 2017).

6. Conclusion

In conclusion, our data demonstrate that the three cysteine residues of AIF can engage in disulfides, producing DLC with AIF itself or with cellular proteins. *In vitro*, such DLC can be reduced by Trx1, found in mitochondria, supporting the previously observed interaction between AIF and Trx1.

7. Acknowledgements

This study was supported by CNPq (573530/2008-4, 401591/2014-0, 420782/2016-8), CAPES-Print (88881.311846/2018-01) and CAPES (Finance Code 001). Fellowships from CAPES (awarded to SML, PAM) and CNPq (awarded to LSN, SMZ) are also acknowledged.

8. References

- APOSTOLOVA, N.; CERVERA, A.; VICTOR, V. *et al.* Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 2, p. 354-357, 2006.
- BANO, D.; PREHN, J. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. **EBioMedicine**, v. 30, p. 29-37, 2018.
- BENINCÁ, C.; PLANAGUMÀ, J.; DE FREITAS SHUCK, A. *et al.* A new non-canonical pathway of Gα(q) protein regulating mitochondrial dynamics and bioenergetics. **Cell Signal**, v. 26, n. 2, p. 1135-1146, 2014
- CARDENAS-RODRIGUEZ, M.; TOKATLIDIS, K. Cytosolic redox components regulate protein homeostasis via additional localisation in the mitochondrial intermembrane space. **FEBS Letters**, v. 591, n. 17, p. 2661-2670, 2017.
- CHEUNG, E.; JOZA, N.; STEENAART, N. *et al.* Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 17, p. 4061-4073, 2006.
- CHURBANOVA, I.; SEVRIUKOVA, I. Redox-dependent Changes in Molecular Properties of Mitochondrial Apoptosis-inducing Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 9, p. 5622-5631, 2008.
- DANTAS, L.; CHAVES-FILHO, A.; COELHO, F. *et al.* Cholesterol secosterol aldehyde adduction and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase: Potential implications in ALS. **Redox Biology**, v. 19, p. 105-115, 2018.
- HANGEN, E.; FÉRAUD, O.; LACHKAR, S. *et al.* Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. **Molecular Cell**, v. 58, n. 6, p. 1001-1014, 2015.
- JOZA, N.; SUSIN, S.; DAUGAS, E. *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 549-554, 2001.
- KLEIN, J.; LONGO-GUESS, C.; ROSSMANN, M. *et al.* The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 419, n. 6905, p. 367-374, 2002.
- KRITSILIGKOU, P.; CHATZI, A.; CHARALAMPOUS, G. *et al.* Unconventional Targeting of a Thiol Peroxidase to the Mitochondrial Intermembrane Space Facilitates Oxidative Protein Folding. **Cell Reports**, v. 18, n. 11, p. 2729-2741, 2017.
- LIMA, D.; DE LIMA, T.; BALBUENA, T. *et al.* SIM-XL: A powerful and user-friendly tool for peptide cross-linking analysis. **Journal of Proteomics**, v. 129, p. 51-55, 2015.
- LIMA, D.; MELCHIOR, J.; MORRIS, J. *et al.* Characterization of homodimer interfaces with cross-linking mass spectrometry and isotopically labeled proteins. **Nature Protocols**, v. 13, n. 3, p. 431-458, 2018.

LIN, J.; NAKAGAWA, A.; SKEEN-GAAR, R. *et al.* Oxidative Stress Impairs Cell Death by Repressing the Nuclease Activity of Mitochondrial Endonuclease G. **Cell Reports**, v. 16, n. 2, p. 279-287, 2016.

MEYER, K.; BUETTNER, S.; GHEZZI, D. *et al.* Loss of apoptosis-inducing factor critically affects MIA40 function. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 7, p. e1814-e1814, 2015.

MIRAMAR, M.; COSTANTINI, P.; RAVAGNAN, L. *et al.* NADH Oxidase Activity of Mitochondrial Apoptosis-inducing Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16391-16398, 2001.

NAKAO, L.; EVERLEY, R.; MARINO, S. *et al.* Mechanism-based Proteomic Screening Identifies Targets of Thioredoxin-like Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 9, p. 5685-5695, 2015.

OTERA, H.; OHSAKAYA, S.; NAGAURA, Z.; ISHIHARA, N.; MIHARA, K. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 7, p. 1375-1386, 2005.

SEVRIOUKOVA, I. Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 12, p. 2545-2579, 2011.

SHELAR, S.; KAMINSKA, K.; REDDY, S. *et al.* Thioredoxin-dependent regulation of AIF-mediated DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 125-136, 2015.

SHEN, S.; GUO, M.; XIONG, Z. *et al.* AIF inhibits tumor metastasis by protecting PTEN from oxidation. **EMBO reports**, v. 16, n. 11, p. 1563-1580, 2015.

SUSIN, S.; LORENZO, H.; ZAMZAMI, N. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441-446, 1999.

SCHWARZ, C.; NICKELSEN, J. 2D Diagonal Redox SDS-PAGE of Proteins <http://www.bio-protocol.org/e781>, Vol 3, Iss 11, 2013.

TROULINAKI, K.; BÜTTNER, S.; MARSAL COTS, A. *et al.* WAH-1/AIF regulates mitochondrial oxidative phosphorylation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cell Death Discovery**, v. 4, n. 1, 2018.

VAHSEN, N.; CANDÉ, C.; BRIÈRE, J. *et al.* AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 23, p. 4679-4689, 2004..

VÖGTLE, F.; BURKHART, J.; RAO, S. *et al.* Intermembrane Space Proteome of Yeast Mitochondria. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 12, p. 1840-1852, 2012.

WINTERBOURN, C. The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, **Methods Enzymol.** Part C, p. 3-25, 2013.

Supplementary Material

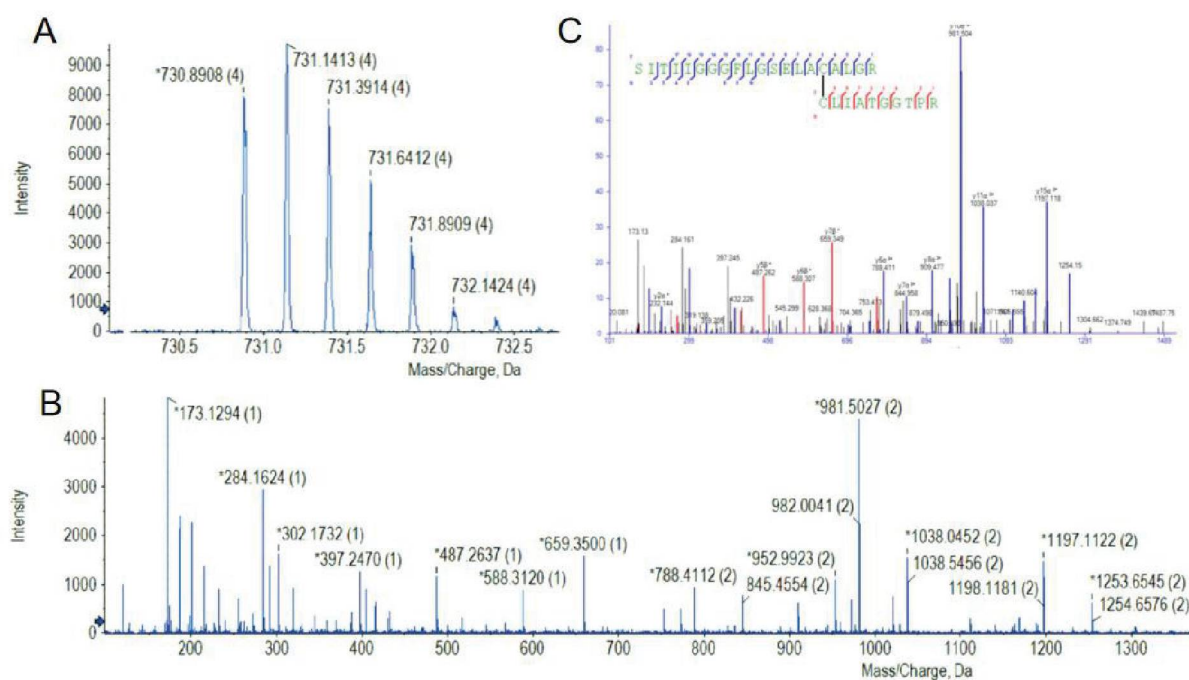


Figure S1. Identification of a disulfide cross-link in AIF between residues 317 and 256. (A) MS spectra showing the isotopic distribution pattern of m/z 730.8908 (4+). (B) MS/MS spectra of cross-linked peptide at m/z 730.8908. (C) Matched results from SIM-XL software showing cross-link formation and identified ion peaks. In this study, we analyzed fragmentation patterns of disulfide-linked heterodimeric peptides from AIF protein after diamide oxidation. The spectra show fragmentation characteristics of disulfide linkage. The blue ions indicate fragments derived from peptide SITIIGGGFLGSELA³¹⁷CALGR and red ions from ²⁵⁶CLIAITGGTPR sequence.

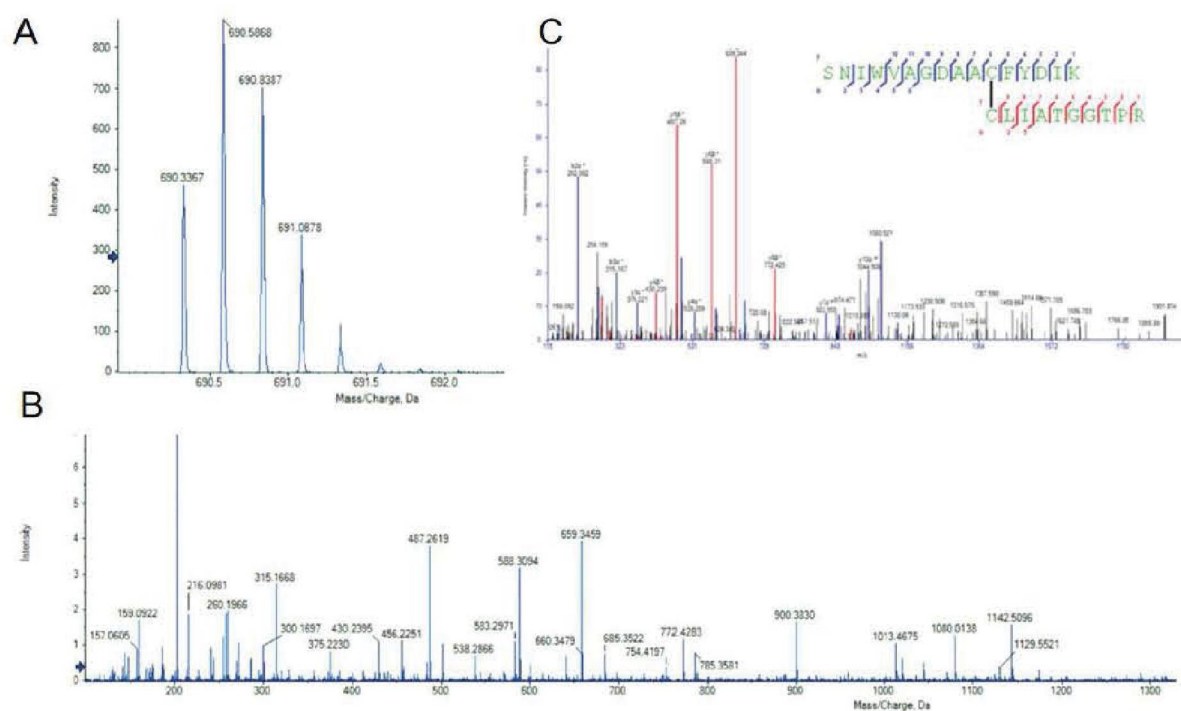


Figure S2. Identification of a disulfide cross-link in AIF between residues 441 and 256. (A) MS spectra showing the isotopic distribution pattern of m/z 690.3367 (4+). (B) MS/MS spectra of cross-linked peptide at m/z 690.3367. (C) Matched results from SIM-XL software showing cross-link formation and identified ion peaks. In this study, we analyzed fragmentation patterns of disulfide-linked heterodimeric peptides from AIF protein after diamide oxidation. The spectra show fragmentation characteristics of disulfide linkage. The blue ions indicate fragments derived from peptide SNIWVAGDAA⁴⁴¹CFYDIK and red ions from ²⁵⁶CLIATGGT²⁵⁶PR sequence.

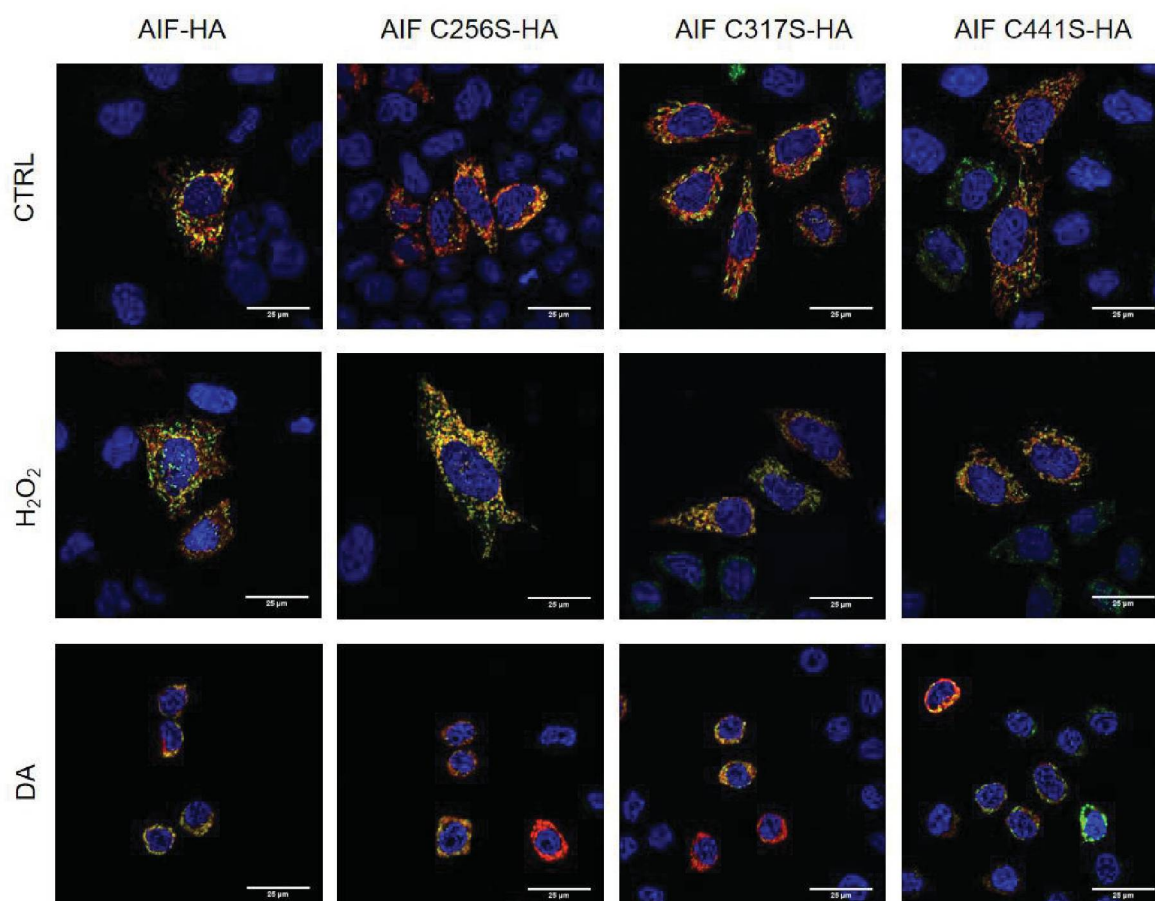


Figure S3. Mitochondrial localization of AIF-HA, AIF C256S-HA, AIF C317S-HA and AIF C441S-HA overexpressed in HeLa cells. HeLa cells were transfected with the corresponding plasmids, and with the pCDNA 3-MtDsRed plasmid, to stain mitochondria. Forty eight h later, they were not treated or exposed to 0.5 mM hydrogen peroxide for 2 hours or to 75 μ M diamide for 10 minutes at 37°C. After fixing, cells were stained with anti-HA and anti-rabbit antibody-Alexa Fluor 488. Nucleus were stained with DAPI.

Table S1 – Cloning primers sequences. Underlined sequence refers to enzyme restriction site. Sequence in *italic* corresponds to human Influenza Hemagglutinin (HA).

Primer	Sequence
hAIF EcoRI F	5' CGGAATT <u>C</u> ATGTTCCGGTGTGGAGGC 3'
hAIF-HA Sal I R	5' CAGGGT <u>CGACT</u> <i>TCATGCGTAATCTGGAACAT</i> <i>CGTATGGGGTAGTCTTCATGAATGTTG</i> 3'
hAIF Δ 1-120 EcoRI F	5' CGGAATT <u>C</u> GAGGAAGTTCCTCAAGACAAG 3'
hAIF Δ 1-120 SalI R	5' CAGGGT <u>CGACT</u> CAGTCTTCATGAATGTTG

Table S2. Mutagenic primers sequences, designed by Primer X software (<http://www.bioinformatics.org/primerx/>)

Primer	Sequence
C256SF	5'CTCAAATAACCTATGAAAAGAGCTTGATTGCAAC AGGAGG3'
C256SR	5' CCTCCTGTTGCAATCAAGCICTTTTCATAGGTTATTTGA G 3'
C317SF	5' GTAGCGAACTGGCCAGCGCTCTTGGCAGAAAG 3'
C317SR	5' CTTTCTGCCAAGAGCGCIGGCCAGTTCGCTAC 3'
C441SF	5' GGCAGGAGATGCTGCAAGCTTCTACGATATAAAG 3'
C441SR	5' CTTTATATCGTAGAAGCITGTCAGCATCTCCTGCC 3'

ANEXO 2- TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO DE YDR286C-TEV-HA

Como alternativas para expressar a YDR286C solúvel foi feita a clonagem da proteína com a proteína S (KETAAAKFERQHMDs) como etiqueta de solubilidade. Para isso foram usados os *primers* 1 e 2 da tabela A1 usando como molde o vetor p426gpd-YDR286C-TEV-HA. A presença dessa pequena proteína com resíduos polares no C-terminal da YDR286C-TEV-HA não ajudou na solubilidade da mesma (FIGURA A1). O vetor p426gpd-YDR286C-TEV-HA foi usado como base para a deleção dos 12 aminoácidos do N-terminal, referente a sequência sinalizadora mitocondrial. Os *primers* usados foram o 3 e 4 da tabela A1. A deleção desse peptídeo sinal também não auxiliou na solubilidade de YDR286C. Um teste paralelo foi realizado com a proteína humana C5orf63, clonada no vetor de expressão em leveduras para avaliar sua solubilidade. Os *primers* usados foram 5 e 6 da tabela A1, e o *template* o vetor pCIneo C5ORF63-TEV-HA (NAKAO, não publicado). Apesar da sua expressão ser maior que a YDR286C, ela foi detectada majoritariamente na fração insolúvel (FIGURA A2). Também foi tentada a subclonagem de YDR286C-TEV-HA no vetor pET21b, entre os sítios EcoRI e Sall, para expressão em bactérias. No entanto após a expressão com 0,2 mM de IPTG por 3 horas a 37°C a proteína foi detectada apenas na fração insolúvel (FIGURA A2).

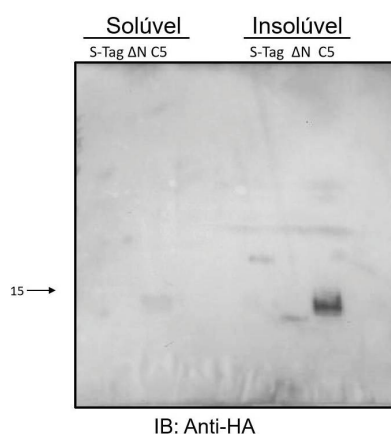
Tabela A1. PRIMERS PARA CLONAGEM DE YDR286C-TEV-HA NO VETOR p426gpd ou pET21b, COM DELEÇÃO NO N-TERMINAL, S-TAG NO C-TERMINAL E C5orf63.

Primer	Sequência
1- YDR286C EcoRI F1	5'CTGGAATTCATGTTGAGAGCGTT CCGCTGTTCTATACAT3'
2- YDR286C-TEV-HA S-tag R	5'GACGTCGACTCAGCTATCCATAT GCTGGCGTTCAAATTTGCGCGCC GCGGTTTCTTTAGCGTAATCTGGA ACATCGTATGGGTA3'
3- ΔN YDR286C EcoRI F	5'CGTGGGAATTCATGAGGGTATTGT TACATGATGCTGGAGTGAAA 3'
4- YDR286C-TEV-HA Sall R	5'TCAAGCGTAATCTGGAACATCGT ATGGGTAGCCCTGAAAATAAAGAT

	TCTCTCTAGATTGCATTCTCCTTAT TTTATCACTGATATCGTCT3'
5- C5orf63 EcoRI F	5'CGTGGGAATTCATGCTCTGGTTTC AAGGAAATAGCATGCAA3'
6- C5orf63 XhoI R	5'GAACCTCGAGTCAGCCTCCAGT ACTTTGCTGCTCAAGTTT3'

FONTE: A autora (2019).

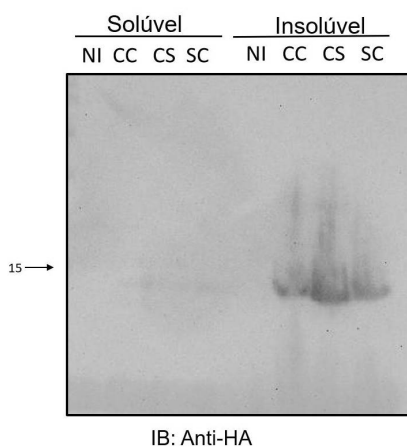
FIGURA A1. EXPRESSÃO DE YDR286C-TEV-HA S-Tag, ΔN e C5orf63 EM LEVEDURAS



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Leveduras transformadas com p426gpd-YDR286C-TEV-HA S-Tag, ΔN e p426gpd-C5orf63 (C5) foram lisadas e separadas em parte solúvel e insolúvel. O lisado foi separado eletroforéticamente por SDS-PAGE e analisado por Western Blot. A marcação foi realizada com anti-HA.

FIGURA A2. EXPRESSÃO DE YDR286C-TEV-HA EM LEVEDURAS



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Bactérias BL21 (DE3) transformadas com pET21b YDR286C-TEV-HA CC, CS e SC foram lisadas e separadas em parte solúvel e insolúvel. O lisado foi separado eletroforéticamente por SDS-PAGE e analisado por Western Blot. A marcação foi realizada com anti-HA.